

Aus dem Institut für Pathologie  
Klinikum Augsburg  
Akademisches Lehrkrankenhaus  
der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München  
Chefarzt: Prof. Dr. Bruno Märkl

**Prognostische Relevanz der Lymphknotengröße beim nodal positiven  
Kolonkarzinom**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Philipp Emanuel Schrembs  
aus  
Augsburg  
2019

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter

Prof. Dr. Bruno Märkl

Mitberichterstatter

Prof. Dr. Jens Neumann

PD Dr. Florian Beigel

PD Dr. Clemens Gießen-Jung

Dekan

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung

06.06.2019



## Inhaltsverzeichnis

Alphabetisches Wörterverzeichnis mit Erklärungen.....	2
1 Einleitung .....	3
1.1 Epidemiologie des Kolonkarzinoms .....	3
1.2 Pathogenese .....	5
1.3 Histologischer Typ.....	7
1.4 Hereditäre und familiäre Kolonkarzinome.....	9
1.5 Klassifikation .....	10
1.5.1 TNM-Klassifikation .....	10
1.5.2 UICC-Stadien .....	12
1.6 Therapeutische Prinzipien.....	12
1.6.1 Operation, komplette mesokolische Exzision (CME).....	12
1.6.2 Chemotherapie und Risikofaktoren .....	13
1.7 Kurzdarstellung und Problematik des Lymphknotenstagings beim Kolon-karzinom ....	14
1.7.1 Aktuelle Empfehlungen.....	14
1.7.2 Insuffizienter N-Status .....	15
1.8 Stage migration, Immunsystem und Fragestellung .....	15
1.8.1 Stage migration.....	15
1.8.2 Cancer immunoediting und Immune contexture.....	17
1.8.3 Immunsystem und Lymphknotengröße.....	18
2 Material und Methoden .....	19
2.1 Zielsetzung.....	19
2.2 Patientenkollektiv, klinisch-pathologische Befunde .....	20
2.3 Metrische Analyse der Lymphknoten .....	21
2.4 Kategorien-Einteilung, MSR-Wert .....	21
2.5 Statistik.....	23
3 Ergebnisse .....	24
3.1 Klinisch-pathologische Daten .....	24
3.2 Lymphknoten.....	25
3.3 Welche Faktoren beeinflussen die Anzahl aufgefundener LK? .....	28
3.4 Welche Faktoren beeinflussen die LK-Größe? .....	29
3.5 Prognostische Relevanz von LK-Parametern .....	30
3.6 Multivariable Analyse .....	34
3.7 Risikofaktoren für das Auftreten von Fernmetastasen .....	38
4 Diskussion .....	39
4.1 Über metastasierte LK und deren Größe.....	39
4.2 Die LK-Größe und damit zusammenhängende Parameter .....	41
4.3 Die Anzahl aufgefundener Lymphknoten.....	42
4.4 Über die LK-Größe und deren prognostische Relevanz.....	43
4.5 Welche Rolle spielen die kleinen Lymphknoten? .....	49
4.6 Stärken und Schwächen der vorliegenden Studie .....	50
5 Zusammenfassung.....	52
6 Literaturverzeichnis: .....	53
7 Abbildungsverzeichnis .....	58
8 Tabellenverzeichnis .....	59
9 Abkürzungen.....	60

## Alphabetisches Wörterverzeichnis mit Erklärungen

**APC und  $\beta$ -Catenin:**  $\beta$ -Catenin ist ein potentiell transkriptionsförderndes Onkogen. APC ist Schlüsselenzym im  $\beta$ -Catenin-Signalweg. Proteasomaler Abbau von  $\beta$ -Catenin bei Anwesenheit von intaktem APC. APC außerdem wichtiger Vermittler bei Chromosomensegregation, verbindet Mikrotubuli und Kinetochore der Metaphasen-chromosome. Gestörte Funktion führt zu fehlerhafter Segregation und chromosomaler Instabilität.

**BRAF:** Kodiert für eine Serin/Threonin-Protein Kinase, welche an wichtigen Signalkaskaden für Zellwachstum und Apoptose teilnimmt. Bei vielen Tumorkrankheiten konnten BRAF-Mutationen nachgewiesen werden (Melanom, Haarzell-leukämie, papilläres Schilddrüsen-karzinom, kolorektales Karzinom etc.). Gebrauch von BRAF-Inhibitoren bereits beim metastasierten Melanom.

**CD45RO<sup>+</sup> Memory-T-Zellen:** Zellen, die Kontakt zu einem Antigen hatten und deshalb schneller und intensiver auf erneuten Antigenkontakt reagieren.

**Konventionelle LK-Dissektion:** Fixierung des Operationspräparats in Formalin, am Folgetag Entfernen des perikolischen Fettgewebes und Schneiden in dünne Schichten; Begutachtung und Palpation der Schichten auf etwaige LK.

**KRAS:** GTPase-Protein als wichtiger Transduktor bei vielen intrazellulären Signalwegen. Mutation im entsprechenden Gen ist oft essentieller Bestandteil der Karzinogenese.

**LN5-Einteilung:** Zuteilung eines Falles zur Gruppe LN5-positiv, wenn 7 oder mehr LK  $>5\text{mm}$ ; Zuteilung eines Falles zur Gruppe LN5-negativ, wenn weniger als 7 LK  $>5\text{mm}$ .

**LN<sub>R</sub>:** (*Lymph node ratio*) Verhältnis metastasierter LK zur Gesamtzahl resezierter LK.

**Loss of heterozygosity:** (z.B. hereditärer) Verlust der Heterozygotie eines Allels (eines Tumor-Suppressor-Gens) durch Mutationen oder epigenetische Einflüsse. Nach Verlust des zweiten (noch funktionierenden) Allels hohe Wahrscheinlichkeit für Tumorigenese.

**Methylen-Blau-Technik:** Kanülierung der Arteria mesenterica des unfixiert übersandten Operationspräparats, Injektion von 15-20ml Methylenblau, dadurch Blaufärbung der Schleimhaut, Gefäße und insbesondere der LK. Fixierung in Formalinlösung über Nacht. Entfernen des perikolischen Fettgewebes und Lamellierung analog zur konventionellen Technik. Durch Blaufärbung deutliche Abgrenzung der LK vom Restgewebe.

**MSI-L, MSI-H, MSS:** MSI-L (MSI-low), wenn einer der vier Marker hMSH-2, hMLH-1, hMSH-6, hPMS-2 eine Instabilität aufweist. MSI-H (MSI-high), wenn mind. zwei der Marker eine Instabilität aufweisen. MSS (MSI-stabil), wenn keiner der genannten Marker eine Instabilität aufweist.

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie des Kolonkarzinoms

Darmkrebs ist die zweithäufigste zum Tode führende Krebserkrankung weltweit. Im einleitenden Kapitel umfasst der Begriff Darmkrebs alle bösartigen Tumoren des Dickdarms (Kolonrektum) und die Analkarzinome. Die seltenen bösartigen Geschwülste des Dünndarms werden in den Zahlen nicht berücksichtigt.

In Deutschland erkrankten im Jahr 2013 ca. 62.400 Menschen an Darmkrebs neu. Im gleichen Jahr starben etwa 25.700 Menschen an Darmkrebs. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 72,9 (Frauen) und 70,3 Jahren (Männer). Das relative 5-Jahres-Überleben lag bei 63%. Das Robert Koch Institut prognostiziert für 2020 etwas weniger als 60.000 Neuerkrankungen [1].

Tabelle 1: Epidemiologische Kennzahlen für Darmkrebs, Deutschland, 2013; zum Vergleich ausgewählte Ergebnisse für die Europäische Union

Neuerkrankungen	Frauen	Männer	Sterbefälle	Frauen	Männer
Absolute Zahl	28.360	34.050	Absolute Zahl	12.085	13.608
Mittleres Erkrankungsalter	72,9	70,3	Mittleres Sterbealter	78,1	74,0
Rohe Rate	68,9	86,3	Rohe Rate	29,3	34,5
Altersstandardisierte Rate	36,3	56,6	Altersstandardisierte Rate	13,0	21,6
Aktueller Trend <sup>1</sup>	-2,0%	-1,7%	Aktueller Trend <sup>1</sup>	-3,1%	-2,4%
Altersstandardisierte Rate (EU)	36,1	59,0	Altersstandardisierte Rate (EU)	13,8	23,8
Prognose für 2020 (absolute Zahl)	25.700	32.400	Aktueller Trend (EU) <sup>1</sup>	-1,5%	-1,1%
Überleben			Prävalenz		
Relatives 5-Jahres-Überleben	63%	63%	5-Jahres-Prävalenz	95.120	114.190
Relatives 10-Jahres-Überleben	60%	57%	10-Jahres-Prävalenz	162.180	189.340

Quelle:

[http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen\\_download.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?__blob=publicationFile) (Seite 28, aufgerufen am 04.11.2017)

Die Inzidenzraten für die Tumoren des absteigenden Dickdarms und Enddarms sind seit etwa 2003 rückläufig, die der Tumoren des aufsteigenden Dickdarms und des Querkolons haben sich hingegen stabilisiert. Die Inzidenz des Analkarzinoms nimmt zu (Abb. 1). Der Zusammenhang zwischen Rückgang der Inzidenz und Einführung der Endoskopie-Vorsorgeuntersuchung im Rahmen der gesetzlichen Krebsfrüherkennung im Jahr 2002 ist nachvollziehbar [1].

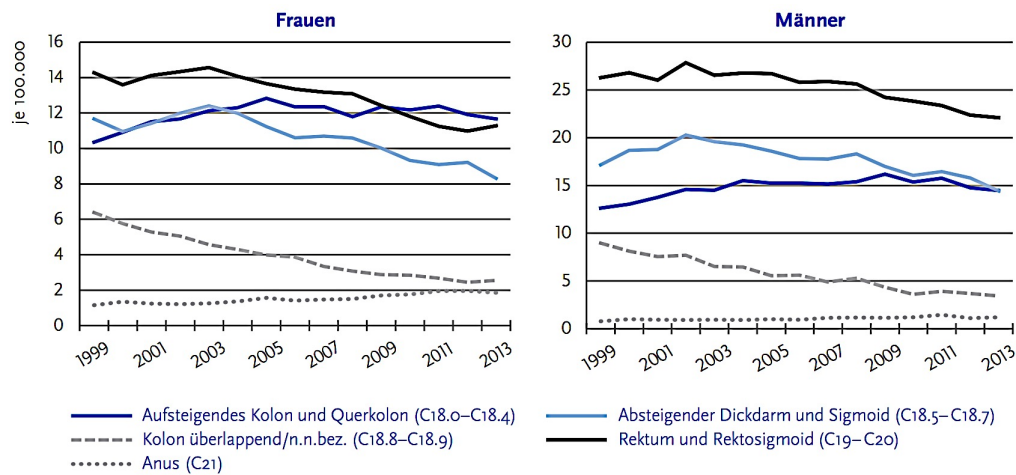


Abbildung 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungsraten, Darmkrebs, nach Lokalisation und Geschlecht, Deutschland 1999-2013;

Quelle:

[http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen\\_download.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?__blob=publicationFile) (Seite 29, aufgerufen am 04.11.2017)

Dass die Inzidenzraten insbesondere im absteigenden Darmabschnitt und Enddarm abgenommen haben, ist mit Studien, die die größte Wirksamkeit der Endoskopie-Vorsorgeuntersuchung in diesen Darmabschnitten zeigen, in Einklang zu bringen [2]. Während die Inzidenz früher (T1/2) und fortgeschrittener (T3/4) Tumoren etwa in gleichem Umfang rückläufig war, zeigten die in-situ-Karzinome einen deutlichen Anstieg (Abb. 2). Auch das spricht für die Effizienz der Vorsorgeuntersuchung [1].

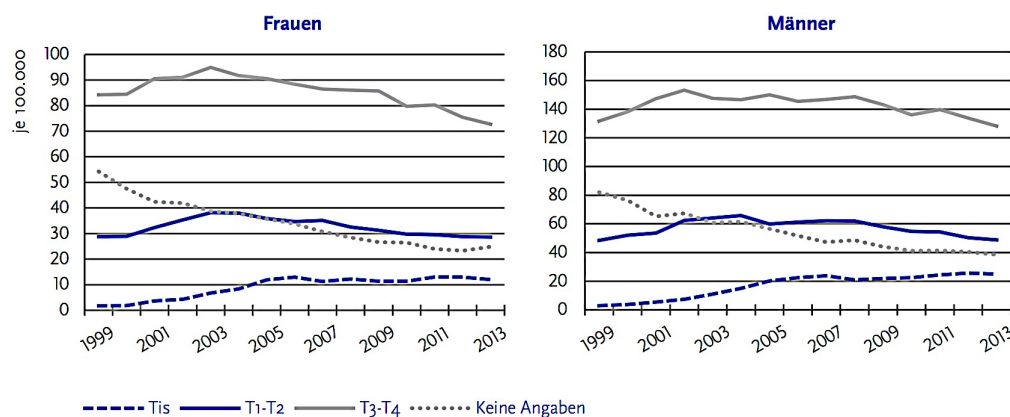


Abbildung 2: Altersstandardisierte Neuerkrankungsraten, Darmkrebs inkl. in-situ-Karzinome, nach T-Stadium und Geschlecht, Alter ab 55 Jahren, Deutschland 1999-2013;

Quelle:

[http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen\\_download.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?__blob=publicationFile) (Seite 29, aufgerufen am 04.11.2017)

Im innereuropäischen und internationalen Vergleich gibt es deutliche Unterschiede. In vielen Nachbarländern Deutschlands ist der Trend einer rückgängigen Inzidenz nicht erkennbar. Indessen fallen die Inzidenzraten in den USA schon seit den 1980er Jahren (Abb. 3)[1-3].

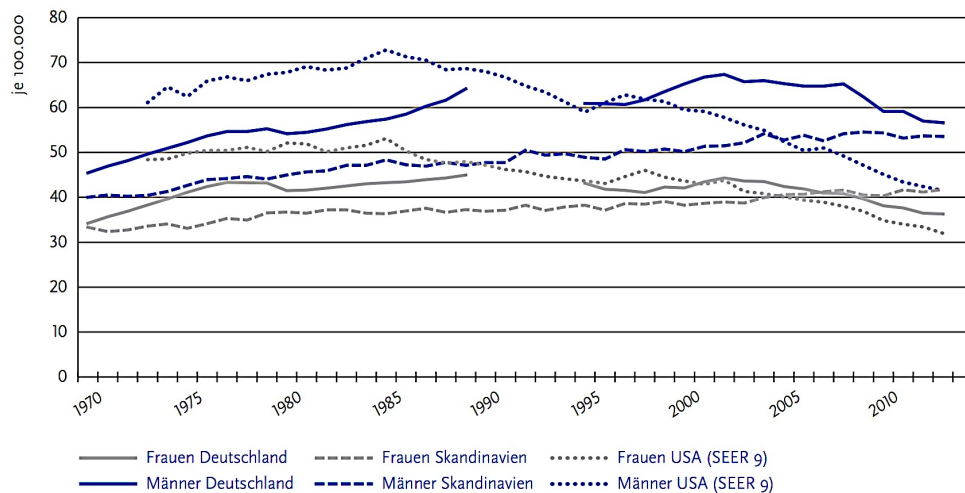


Abbildung 3: Altersstandardisierte Neuerkrankungsraten, in Deutschland, Skandinavien und den USA, 1970-2013;

Quelle:

[http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen\\_download.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?__blob=publicationFile) (Seite 30, aufgerufen am 04.11.2017)

## 1.2 Pathogenese

Das kolorektale Karzinom entsteht, wenn Mutationen in Onkogenen, Tumor Suppressor-Genen oder in solchen Genen aufgetreten sind, die an der DNA-Reparatur partizipieren. Es werden sporadische (70%), hereditäre (5%) und familiäre (25%) Karzinome unterschieden, abhängig vom Ursprung der Mutation. Meist liegt dieser zellulären Katastrophe einer von vier pathogenetischen Mechanismen oder aber eine Kombination derer zu Grunde: Chromosomale Instabilität (CIN), Mikrosatelliten-Instabilität (MSI), CpG island methylator phenotype (CIMP) oder alternative Karzinogenese.

CIN stellt den klassischen Weg dar, da bis zu 80% der sporadischen Fälle auf den CIN-Mechanismus zurückzuführen sind. Eine intrinsisch erhöhte Mutationsrate weniger Zellen führt zu Duplikation, Amplifikation oder Verlust von ganzen Chromosomen oder deren Teile. Folgen sind Aneuploidie und erhöhte Raten von Loss of heterozygosity (LOH, Wörterverzeichnis) und damit Fehler in der Funktion essentieller Gene wie APC, KRAS, BRAF, PI3K oder TP53 (Wörterverzeichnis).



Damit werden z.B. Tumor-Suppressorgene außer Kraft gesetzt oder proliferationsstimulierende Signalkaskaden von der zellulären Kontrolle entkoppelt und aktiviert. Am Anfang steht meist eine Mutation des APC-Gens, entweder somatisch erworben oder als Keimbahnmutation mitgegeben. Makroskopisches Korrelat des CIN-Mechanismus ist die bekannte Adenom-Karzinom-Sequenz, und die Vorläuferläsionen sind das tubuläre und tubulovillöse Adenom [4-6].

Die Initialzündung bei der sog. serratierten Karzinogenese macht eine BRAF-Mutation (Wörterverzeichnis). Es wird vermutet, dass durch die Mutation im BRAF-Gen und die damit verbundenen Alterationen wichtiger Signalwege das Auftreten epigenetischer Veränderungen in Form von Hypermethylierungen begünstigt wird. Die BRAF-Mutation ist streng assoziiert mit diesen Hypermethylierungen des Genoms. So kommt es zum CpG island methylator phenotype (CIMP). Regionen im Genom mit erhöhter CpG-Dinukleotiddichte werden als CpG-Inseln bezeichnet. In diesem Kontext sind diejenigen CpG-Inseln wichtig, die innerhalb eukaryotischer Promotor-Regionen lokalisiert sind. Diese sind physiologischerweise nicht das Ziel von Methylierungsprozessen. In sog. CIMP-high-Tumoren sind diese CpG-Inseln abnormal hypermethyliert. Diese Hypermethylierung der promotor- assoziierten CpG-Inseln bedingt eine Stilllegung bestimmter Gene (Gen-Silencing), da nur diejenigen Gene abgelesen werden können, die nicht methyliert sind. Die Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen oder anderen wichtigen Genen führt dann letztlich zur Tumorgenese. Es sei noch erwähnt, dass paradoxerweise die Inaktivierung vor allem solche Gene betrifft, deren Expressionsrate ohnehin gering ist [7]. Die Vorläuferläsion des CIMP ist das serratierte Adenom.

Mit der Beschreibung der CIMP-Pathogenese ist auch der Übergang zur Mikrosatelliten-Instabilität getan, denn je nachdem, welche Gene von der Stilllegung betroffen sind, fällt die Funktion wichtiger Reparatur-Enzyme aus oder nicht. Mikrosatelliten sind kurze, aus zwei bis sechs Basenpaaren (häufig C und A) bestehende, sich wiederholende DNA-Sequenzen. Die Länge der repetitiven Abschnitte ist interindividuell verschieden, jedoch somatisch konstant, d.h. bei einer Person in allen Zellen gleich [6]. Ihr monotones Muster macht sie gewissermaßen anfällig für Fehler, die sich während der Replikation einschleichen. Diese Fehler werden physiologischerweise von den Mismatch-Repair-Proteinen (MMR) der Zelle erkannt, eine Gruppe von Enzymen, die Replikationsfehler aufspüren und beheben.

Bei etwa 90% der Lynch-Syndrome und 10-15% der sporadischen kolorektalen Karzinome liegt eine MMR-Insuffizienz vor. Die Folge sind längenveränderte Mikrosatelliten. Betrifft es kodierende Genabschnitte, kann es zu Leserasterverschiebungen oder zur Expression verkürzter, funktionsuntüchtiger Proteine kommen. Im Falle von wachstumsinhibierenden Proteinen, wie z.B. das des Transforming-growth-factor-Rezeptor-II-Gens, erfährt die Zelle einen pathologischen Proliferationsvorteil [6, 8]. Um die MMR-Insuffizienz der Zelle nachzuweisen, werden entsprechende Gene molekularpathologisch überprüft bzw. deren Enzymprodukte immunhistochemisch anvisiert. Diese Gene werden als hMSH-2, hMLH-1, hMSH-6, hPMS-2 (Wörterverzeichnis) bezeichnet und sind im Fall der MMR-Insuffizienz entweder durch eine Keimbahnmutation oder als Konsequenz der Hypermethylierung mutativ beschädigt.

Am Anfang des sog. alternativen Karzinogeneseweges steht eine KRAS-Mutation (Wörterverzeichnis). Da dieser Pfad ebenfalls häufig mit Hypermethylierungen vergesellschaftet ist, ergibt sich somit ein alternativer Faktor für die Entstehung einer MSI. Insgesamt stellt der alternative Weg einen sehr heterogenen Fall dar, da neben MSI auch Aneuploidie und chromosomale Aberrationen vorkommen können.

### **1.3 Histologischer Typ**

Im Folgenden werden die verschiedenen histologischen Subtypen des Kolonkarzinoms skizziert, nicht jedoch die der benignen Vorstufen des Karzinoms, der Adenome.

Mit 80-85% ist das Adenokarzinom der häufigste Subtyp. Es zeigt primär glanduläre Strukturen, welche auch die Basis für das histologische Grading darstellen. Medulläre Karzinome, charakterisiert durch ein solides Baumuster, vesikuläre Zellkerne und viele intratumorale Lymphozyten, machen 3,6% der kolorektalen und 8,9% der rechtsseitigen Kolonkarzinome aus. Umgekehrt sind ca. 95% der medullären Karzinome im rechtsseitigen Kolon lokalisiert. Sie sind sehr häufig mikrosatelliten-instabil, 40% sind mit Lymphknotenmetastasen, aber nur wenige mit Fernmetastasen assoziiert. Insgesamt hat das medulläre Karzinom deshalb eine günstigere Prognose [6, 9].

Das mikropapilläre Karzinom gehört zu den jüngeren der histologischen Entitäten. Erstmals im Jahr 2005 beschrieben, liegt es in seiner Reinform nur sehr selten vor. Andere Subtypen können aber eine mikropapilläre Komponente aufweisen. Hier darf dann mit einer erhöhten Rate von Lymphgefäßeinbrüchen gerechnet werden, weshalb das mikropapilläre Karzinom mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko behaftet ist. Große extrazelluläre Schleimansammlungen sind das Diagnostikum muzinöser Adenokarzinome, die sich, abhängig vom MSI-Status, prognostisch unterscheiden. Mikrosatelliten-instabile Tumoren zeigen oft einen besseren Verlauf, indessen sind mikrosatelliten-stabile Tumoren meist deutlich aggressiver [6, 9].

Das serratierte Adenokarzinom mit seinem sägeblattartigen Epithel wird in zwei molekulare Subtypen unterschieden: Der sog. Hochrisikotyp ist der weitaus häufigere Typ. Er ist mikrosatelliten-stabil oder niedrig stabil (MSI-L, Wörterverzeichnis), mehrere Gene sind hypermethyliert und die Prognose ist ungünstig. Der sog. Niedrigrisikotyp ist seltener. Er zeigt fast immer Mutationen im BRAF-Gen sowie eine hohe Mikrosatelliten-Instabilität (MSI-H). Die Prognose ist bei letzterem deutlich besser. Schließlich sei noch das Siegelringzellkarzinom erwähnt, bei dem die monozellulär verschleimten Tumorzellen auffallen. Durch die intrazelluläre Schleimansammlung wird der Nukleus charakteristischerweise in die Zellperipherie gedrängt. Es macht weniger als 1% der kolorektalen Karzinome aus. Für gewöhnlich ist es hoch aggressiv [6, 9].

Auf die restlichen Subtypen wird nicht weiter eingegangen. Sie werden jedoch der Vollständigkeit wegen aufgeführt: Kribriiformes Adenokarzinom vom Komedotyp, adenosquamöses Karzinom, spindelzelliges Karzinom, Plattenepithelkarzinom, undifferenziertes Karzinom.

## 1.4 Hereditäre und familiäre Kolonkarzinome

2-5% der Kolonkarzinome sind hereditär. Diese sind gut definierte Syndrome mit Abweichungen penetranter, gut untersuchter Gene. Hierzu zählen das Lynch-Syndrom (hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom HNPCC) sowie die Gruppe der intestinalen Polyposis-Syndrome: familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), MUTYH-assoziierte Polyposis, verschiedene hamartomatöse Polyposis-Syndrome (Peutz-Jeghers Syndrom, Juveniles Polyposis Syndrom uvm.).

In diesem Abschnitt wird auf die Darstellung der facettenreichen Polyposis-Syndrome bewusst verzichtet, da es zum eigentlichen Thema der Dissertation nicht beiträgt. Indessen soll ein kurzer Abriss des Lynch-Syndroms und des damit verbundenen Phänomens der Mikrosatelliteninstabilität abgefasst werden. Die häufigen familiären Kolonkarzinome werden lediglich kurz paraphrasiert.

Das Lynch-Syndrom macht 2-5% der kolorektalen Karzinome aus; es besteht ein Lebenszeitrisiko von 50-80% [10]. Betroffene haben ein erhöhtes Risiko, verschiedene bösartige Tumoren zu entwickeln, insbesondere kolorektale und endometriale Karzinome. Im Vergleich zu den sporadischen Fällen, erkranken Patienten typischerweise bereits in jüngeren Lebensjahren. Es ist interessant, dass die Tumoren sich histologisch durch einen hohen Anteil von intratumoralen Lymphozyten auszeichnen, ein Zeichen erhöhter immunologischer Präsenz. Das Lynch-Syndrom ist die Erkrankung, an der das Phänomen der Mikrosatelliten-Instabilität am besten untersucht wurde.

Interessanterweise haben MSI-H-Kolonkarzinome eine günstigere Prognose als mikrosatelliten-stabile, möchte man doch annehmen, dass ein fehlerhaftes DNA-Reparatursystem diesen Zellen eine besondere Aggressivität verleiht. Eine anerkannte Erklärung hierfür ist, dass häufig auftretende Leserasterverschiebungen zur Produktion antigener Peptide führen. Die Peptide werden von Effektorzellen des Immunsystems erkannt und die entsprechende Tumorzelle als solche wahrgenommen [11].

Fast ein Drittel der kolorektalen Karzinome sind familiär. Der familiäre Typ ist definiert durch das familiär gehäufte Auftreten kolorektaler Karzinome, nach Ausschluss hereditärer Syndrome. Das familiäre Auftreten der Tumoren spricht für eine hereditäre Erkrankung, obschon die verantwortlichen Gene eine geringere

Penetranz aufweisen und weniger gut beschrieben sind. Wahrscheinlich handelt es sich um Gene, die zwar weniger penetrant, aber viel häufiger betroffen sind. Zu der Gruppe der familiären Kolonkarzinome zählen das *High-risk familial, non-syndromic colon cancer* und das *Common familial risk colon cancer*, welche über die Familienanamnese definiert werden. So erhöht sich z.B. das individuelle Risiko, am kolorektalen Karzinom zu erkranken, um 2-4% im Vergleich zur Normalbevölkerung, wenn ein Verwandter ersten Grades von der Erkrankung betroffen war [10, 12].

## 1.5 Klassifikation

### 1.5.1 TNM-Klassifikation

Den Primärtumor betreffend wird folgende Unterteilung vorgenommen [13]:

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ: Infiltration der Lamina propria
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum T4a Tumor perforiert viszerale Peritoneum T4b Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen

Es sei darauf hingewiesen, dass ein invasives Karzinom (T1) erst bei Infiltration der Submukosa, also jenseits der Muscularis mucosae, als solches diagnostiziert wird. Hingegen liegt ein Carcinoma in situ vor, wenn die Tumorzellen zwar die Basalmembran durchbrochen haben, aber noch auf die Lamina propria beschränkt sind (intakte Muscularis mucosae). In diesem Punkt unterscheidet sich die Klassifikation des Kolonkarzinoms von der anderer Tumoren des Verdauungstraktes.

Der Status für regionäre Lymphknoten wird wie folgt angegeben [13]:

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1 bis 3 regionären Lymphknoten <u>N1a</u> : Metastase in 1 regionärem Lymphknoten <u>N1b</u> : Metastasen in 2 bis 3 regionären Lymphknoten <u>N1c</u> : Tumorknötchen bzw. Satellit(en) im Fettgewebe der Subserosa oder im nichtperitonealisierten perikolischen/perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten <u>N2a</u> : Metastasen in 4 bis 6 regionären Lymphknoten <u>N2b</u> : Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten

Der M-Status wird wie folgt angegeben [13]:

M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen <u>M1a</u> : Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionäre Lymphknoten) <u>M1b</u> : Metastasen in mehr als einem Organ <u>M1c</u> : Metastasen im Peritoneum mit/ohne Metastasen in anderen Organen

### 1.5.2 UICC-Stadien

Nach Bestimmung der TNM-Situation wird das Kolonkarzinom einem Stadium zugeordnet [13]. Dieses ist wichtig für Therapie und Prognose.

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0	M0
Stadium II	T3, T4	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T4a	N0	M0
Stadium IIC	T4b	N0	M0
Stadium III	Jedes T	N1, N2	M0
Stadium IIIA	T1, T2	N1a	M0
	T1	N2a	M0
Stadium IIIB	T1, T2	N2b	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T3, T4a	N1	M0
Stadium IIIC	T3, T4a	N2b	M0
	T4a	N2a	M0
	T4b	N1, N2	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1
Stadium IVA	Jedes T	Jedes N	M1a
Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M1b
Stadium IVC	Jedes T	Jedes N	M1c

## 1.6 Therapeutische Prinzipien

### 1.6.1 Operation, komplette mesokolische Exzision (CME)

Die alleinige chirurgische Therapie ist bei Patienten im UICC-Stadium<sup>1</sup> I ausreichend. Nach R0-Resektion und Festlegung auf pN-0 ist die Indikation zur adjuvanten Therapie nicht gegeben. Für Patienten im Stadium III ist eine adjuvante Chemotherapie vorgesehen. Voraussetzung hierfür ist die R0-Resektion. Nach kurativer Resektion *kann* im Stadium II eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden. Einige Studien kommen zum Ergebnis, dass eine adjuvante Therapie im Stadium II keinen signifikanten Überlebensvorteil bringt, andere, wie zum Beispiel die groß angelegte britische QUASAR-Studie, konnten einen Vorteil gegenüber der alleinigen Operation aufzeigen. Die AWMF kommt zum Schluss, dass eine obligate

<sup>1</sup> Auf das Präfix „UICC“ wird fortan verzichtet

adjuvante Therapie im Stadium II von den vorliegenden Studienergebnissen nicht abgeleitet werden kann, wobei aber, in Anbetracht der positiven Studienergebnisse der QUASAR-Studie, ein Nutzen einer adjuvanten Therapie im Stadium II ohne Risikofaktoren nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann [14, 15].

„Die chirurgische Therapie des Kolonkarzinoms sollte die komplette mesokolische Exzision beinhalten“ [14]. Im Jahre 2009 von W. Hohenberger eingeführt, beinhaltet die CME zwei zentrale Punkte, einerseits die scharfe Dissektion entlang der parietalen Schicht des Mesenteriums mit Erhalt der Integrität des viszerale Peritoneums, andererseits die vollständige Resektion der regionalen und zentralen (vertikalen) Lymphabflusswege mit einem zentralen Gefäßstiel [16]. Mehrere Studien konnten nicht nur Verbesserungen hinsichtlich der 5-Jahresüberlebensrate, der Rezidivhäufigkeit und des krankheitsfreien Überlebens seit Einführung der CME aufzeigen, sondern auch höhere LK-Erträge [17-19]. Hohenberger et al. konnten mit dieser Operationstechnik einen Median von 32 untersuchten LK pro Präparat sicherstellen [16].

### **1.6.2 Chemotherapie und Risikofaktoren**

Zum Stadium II „mit Risikofaktoren“ gehören T4-Tumoren, Tumorperforation/-einriss, Notfalloperationen (z.B. bei starker GI-Blutung oder Ileus) und eine zu geringe Zahl untersuchter Lymphknoten. In diesen Fällen sollte die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie erwogen werden [14, 20, 21]. Ebenso ist bei Patienten nach R0-Resektion im Stadium III die Indikation zur Chemotherapie gegeben.

Standard ist eine Oxaliplatin-haltige Therapie, meist als FOLFOX-Kombination (Folinsäure, 5-FU, Oxaliplatin) in mehreren Zyklen.

Folgerichtig werden Patienten zu potentiellen Chemotherapie-Kandidaten, wenn nach der Operation sich eine zu geringe Anzahl untersuchter Lymphknoten ergibt. Warum ist eine zu geringe Anzahl untersuchter Lymphknoten ein Risikofaktor? Anhand welcher Kriterien (falls sie existieren) sollte man das weitere Procedere für diese Patienten festlegen? Diese Fragen werden in den Abschnitten 1.7.2 und 1.8.2 behandelt.



## **1.7 Kurzdarstellung und Problematik des Lymphknotenstagings beim Kolonkarzinom**

### **1.7.1 Aktuelle Empfehlungen**

Die UICC und die S3-Leitlinie der AWMF fordern die histopathologische Untersuchung von mindestens 12 regionären Lymphknoten, um ein adäquates pN-Stadium anzugeben [14]. Allerdings kommt es häufig vor, dass beim Durchsuchen des Operationspräparats deutlich weniger Lymphknoten gefunden werden. In diesen Fällen werden also weniger als 12 Lymphknoten histopathologisch begutachtet. Johnson et al. errechneten in einer Studie aus dem Jahr 2002 einen Durchschnittswert von 8,3 untersuchten Lymphknoten pro Patient bei insgesamt 569 Fällen. Bei nur 22,4% konnten 12 oder mehr Lymphknoten gefunden werden [22]. Die Bestimmung des pN-Status bei weniger als 12 untersuchten Lymphknoten wird als insuffizient bezeichnet.

Um ein Verständnis vom Prozess des LK-Stagings zu vermitteln, werden die gängigen Methoden im alphabetischen Wörterverzeichnis kurz skizziert. Allgemein beginnt das LK-Staging mit der Dissektion im Labor und endet mit der Festlegung auf einen pN-Status durch den Pathologen.

Dass bei der konventionellen Technik insbesondere kleine Lymphknoten übersehen werden, liegt auf der Hand. Außerdem hängt die LK-Ausbeute auch stark von der Expertise und Motivation des Präparators ab.

Im Vergleich zur konventionellen Technik ist die Methylen-Blau-Technik ein neueres und effektiveres Verfahren zur LK-Dissektion. Die durchschnittliche Zahl gefundener Lymphknoten liegt deutlich über der des konventionellen Verfahrens. So konnten Märkl et al. in einer Studie, die zwei Kohorten mit je über 600 Fällen verglichen hatte, die Anzahl der untersuchten Lymphknoten von  $13 \pm 5$  auf  $34 \pm 17$  erhöhen und die Rate der suffizienten pN-Bestimmungen von 62 auf 98% verbessern [23]. Lymphknoten stellen sich als blau schimmernde, umschriebene Gebilde dar, weshalb insbesondere kleinere Knötchen leichter gefunden werden [24].

Nach Paraffin-Einbettung, Zuschnitt und Färbung werden die Gewebeschnitte hinsichtlich etwaiger Metastasierung unter dem Mikroskop untersucht. Entsprechend der TNM-Klassifikation wird dann dem Fall ein N-Status zugeteilt.

### **1.7.2 Insuffizienter N-Status**

Im vorangehenden Abschnitt wurde der Begriff des insuffizienten N-Status erklärt. Die S3-Leitlinie aus dem Jahre 2014 der AWMF für kolorektale Karzinome sieht für R0-operierte Patienten im Stadium II mit ausgewählten Risikofaktoren, darunter der insuffiziente N-Status im Sinne einer zu geringen Anzahl untersuchter Lymphknoten, eine adjuvante Chemotherapie vor [14]. Anlass zu dieser Empfehlung gab der beobachtete Zusammenhang zwischen der Anzahl resezierter (und damit untersuchter) Lymphknoten und der Prognose des Patienten. Eine hohe Zahl untersuchter LK korreliert mit einer besseren Prognose. Dieser proportionale Zusammenhang ist mehrfach bestätigt worden [14, 25]. Auf die Richtigkeit der Behauptung konnten Chang et al. in einer systematischen Übersichtsarbeit in 16 von 17 Studien für das Stadium II hinweisen, außerdem in vier von sechs Studien für das Stadium III. Mehrfach wurde der Parameter LK-Anzahl als unabhängiger prognostischer Parameter mittels multivariater Analysen bestätigt.

## **1.8 Stage migration, Immunsystem und Fragestellung**

### **1.8.1 Stage migration**

In Abschnitt 1.7.2 wurde bereits auf den positiven Zusammenhang zwischen Anzahl untersuchter Lymphknoten und Prognose hingewiesen. Zahlreiche Studien bestätigten die Richtigkeit dieser Korrelation sowohl für Stadium II-Karzinome [26-32] als auch für Stadium III-Karzinome [33-38]. Eine umfassende Übersichtsarbeit hierzu bieten Chang et al. an [25]. Neuerdings wird Ähnliches auch über T1-kolorektale Karzinome berichtet [39]. Die Antwort auf die Frage, weshalb es diese Beziehung zwischen LK-Anzahl und Prognose gibt, scheint nicht so einfach zu sein, wie zuerst angenommen. Eine weit verbreitete, zugegebenermaßen auch verständliche Erklärung ist, dass je mehr LK untersucht werden, desto geringer die Wahrscheinlichkeit ist, einen befallenen LK zu verfehlen; bzw. desto geringer die Wahrscheinlichkeit ist, dass sich falsch-negative Fälle in das Stadium II einschleichen. Umgekehrt bestünde bei z.B. nur sieben untersuchten LK die Gefahr, dass Nummer acht oder neun die gesuchte LK-Metastase wäre; der Patient würde fälschlicherweise als nodal-negativ klassifiziert und demnach die dringend benötigte

adjuvante Chemotherapie verpassen. Dieser Effekt wird im Sinne eines Understaging als Stage migration oder Will Rogers-Phänomen bezeichnet [40].

Dass das Will Rogers-Phänomen nicht ausreicht, um die LK-Anzahl-Prognose-Relation hinreichend zu erklären, zeigen die folgenden zwei interessanten Beobachtungen:

1: Märkl et al. untersuchten die Wahrscheinlichkeit der Metastasenauffindung in Abhängigkeit von der Zahl aufgefundener LK. Es wurde eine sequentielle LK-Präparation durchgeführt und es zeigte sich, dass mit 86% Wahrscheinlichkeit die erste LK-Metastase unter den ersten neun untersuchten LK war. Dies spricht nicht nur für die hohe Effizienz des Personals, die erste Metastase zielsicher aufzuspüren, sondern stellt auch die Notwendigkeit einer großen Zahl aufzusuchender LK in Frage, werden doch die ersten Metastasen, wenn vorhanden, auch unter wenigen LK gefunden. Und dennoch bleibt die Relation zwischen großer LK-Zahl und positiver Prognose [23].

2: Als Konsequenz des immer wieder diskutierten Problems der zu wenig untersuchten LK pro Kolonkarzinom-Fall wurden Techniken entwickelt, die die LK-Erträge deutlich ausdehnten. Aber trotz ungleich mehr untersuchter LK konnte kein Anstieg der Häufigkeit nodal-positiver Fälle verzeichnet werden. Mehrere Studien, welche die Zahlen nodal-positiver Fälle bei der konventionellen LK-Aufbereitungstechnik untersuchten, ließen die mittlere Rate positiver Fälle (also mindestens pN1) bei etwa 37% einpendeln [38, 41-44].

11 Studien zwischen den Jahren 1999 und 2015 untersuchten den Einfluss neuerer LK-Aufbereitungstechniken auf das N-Staging. Acht Autorengruppen konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Höhe der untersuchten LK und dem N-Status nachweisen. Obschon die Häufigkeiten der LK-Metastasen sich zwischen den Autorengruppen leicht unterschieden, konnte kein Anstieg der Häufigkeit durch höhere Zahlen untersuchter LK erzwungen werden [23, 45-54].

Zusammenfassend scheint es, als gäbe es eine zweite Variable, die sowohl die positive Korrelation zwischen LK-Anzahl und Lebenserwartung als auch die Nicht-Einflussnahme hoher LK-Erträge auf das Stadium erklären kann, die Einflussgröße (LK-Anzahl) und Zielgröße (Prognose) gleichermaßen betrifft und zu falschen Schlussfolgerungen verleitet. Wie und warum die LK-Größe als Confounder in Frage kommt, wird in Abschnitt 1.8.3 angedeutet und in der Diskussion ausführlicher beschrieben.

### **1.8.2 Cancer immunoediting und Immune contexture**

Dass das Immunsystem bei Entstehung und Verlauf eines Krebsleidens eine wichtige Rolle spielt, ist bekannt. Weniger geläufig dürfte allerdings das Konzept des Cancer immunoeditings sein. Schreiber et al. prägten den Begriff, mit welchem sie einen neuartigen, ambivalenten Einfluss des Immunsystems auf Malignome beschreiben wollten. Sie waren der Meinung, das Immunsystem habe nicht nur eine repressive Funktion auf Tumorzellen, sondern auch eine stimulierende bzw. selektierende. Mit ihren Untersuchungen an Mäusen konnten sie nachweisen, dass das Immunsystem dem Tumor gewissermaßen auf die Beine helfen kann. In einem Experiment wurden karzinogen-induzierte Tumorzellen von immunkompetenten Mäusen einerseits und immundefizienten Mäusen andererseits isoliert. Diese Tumorzellen wurden dann in zwei Gruppen von Mäusen injiziert: Die eine Zielgruppe bestand aus immunkompetenten, die andere aus immundefizienten Mäusen. Tumorzellen, die von immunkompetenten Mäusen entnommen wurden, formten in beiden Zielgruppen progressiv verlaufende Tumoren. Von immundefizienten Mäusen entnommene Tumorzellen zeigten zwar bei der immundefizienten Zielgruppe, wie erwartet, einen progressiven Verlauf, aber bei der immunkompetenten Zielgruppe war nur in der Hälfte der Fälle ein progressiver Verlauf zu beobachten. Die von immundefizienten Mäusen entnommenen Tumorzellen behielten offensichtlich ihre Immunogenität bei und wurden deshalb als „unedited“ bezeichnet. Die von immunkompetenten Mäusen gewonnenen Tumorzellen wurden möglicherweise bereits beim Heranreifen in frühen Stadien derart von einem aktiven Immunsystem behandelt, dass eine Selektion überlebensfähiger Tumorzellen stattfand, die ihnen das Überleben in beiden Zielgruppen sicherte. Diese Zellen sind also weniger immunogen und wurden als „edited“ bezeichnet [55].

Zusammenfassend wies also die Arbeit von Schreiber et al. auf die doppeldeutige Rolle des Immunsystems beim Umgang mit Krebszellen hin. Nicht alle Zeichen einer aktiven Immunantwort sind demnach mit einer besseren Aussicht auf Heilung gleichzusetzen, denn die Interaktion des Immunsystems mit dem Tumor kann diesem den entscheidenden Überlebensvorteil geben.

Und doch gibt es einige Zeichen einer floriden Immunantwort, die mittlerweile als Marker einer besseren Prognose anerkannt sind. Eine starke lymphozytische Infiltration des Tumors, insbesondere mit CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen und CD45RO<sup>+</sup> Memory-T-Zellen, ist assoziiert mit höheren Überlebenswahrscheinlichkeiten bei einer Vielzahl von Tumoren [11, 56]. Die Autorengruppe Fridman, Galon et al. verwenden hierzu den Begriff „immune contexture“ (Immun-Gefüge/Struktur), um die feingliedrige Struktur des Immunsystems, welches den Tumor umgibt, zu beschreiben. Außerdem bewerten sie die verschiedenen Komponenten dieses Gefüges (Immunzellen, Zytokine etc.) und deren (mikro-)anatomische Lokalisation hinsichtlich Prognose bzw. Aussagekraft für den Verlauf des Tumorleidens. Die Autorengruppe arbeitete einen Immune score aus, der, die Komponenten des Immungefüges berücksichtigend, ein neues quantitatives Prognosekriterium darstellte. Er basiert auf der Aufzählung von zwei Zelllinien (CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen und CD45RO<sup>+</sup> Memory-T-Zellen) in zwei verschiedenen Tumorregionen (Zellen im Tumorzentrum lokalisiert, Zellen an der Tumorfront lokalisiert). Die Höchstzahl ergibt somit vier. Die Zweckmäßigkeit des Punktesystems soll am Beispiel der Rezidivhäufigkeit beim kolorektalen Karzinom gezeigt werden: Patienten mit primärem Karzinom, pN0-Status und ohne Anhalt auf Fernmetastasen werden normalerweise operiert und nicht einer Chemotherapie zugeführt. Ein nicht unerheblicher Anteil (ca. 20-25%) [11] dieses Patientenkollektivs wird jedoch von einem Tumorrezidiv betroffen sein. Bis auf den Immune score existiert zur Zeit kein weiterer Marker, der die Rezidivwahrscheinlichkeit in diesen Fällen einschätzen könnte. Pages et al. konnten die Nützlichkeit des Immune scores nachweisen. Ein hoher Punktwert von vier war mit einer niedrigeren Rezidivhäufigkeit von 4,8% verbunden, verglichen mit einer Rezidivhäufigkeit von 72% bei niedrigen Punktwerten (0 und 1) [11, 57]. Der Immune score kann offensichtlich die pN0- Patienten hervorheben, die möglicherweise von einer adjuvanten Therapie profitieren würden. Dies ist eine Situation, der momentan noch kein anderer Marker gerecht wird.

### **1.8.3 Immunsystem und Lymphknotengröße**

In Abschnitt 1.8.1 wurde das erste Mal die LK-Größe als möglicher Confounder bei der LK-Anzahl-Prognose-Relation bezeichnet. Falls diese ein solcher wäre, könnte

man z.B. einen Immune score, wie er oben beschrieben wurde, durch einen zusätzlichen Faktor (LK-Größe) erweitern. Möglicherweise ergäbe dies eine neue Leitstruktur, entlang derer man sich orientieren könnte bei der Entscheidung, ob eine adjuvante Chemotherapie gerechtfertigt ist.

Warum ist die LK-Größe als Zweitvariable plausibel? Die LK-Größe beeinflusst die Anzahl aufgefundener LK dahingehend, dass größere LK schlicht einfacher bei der Präparation erkannt werden. Angenommen der Anteil metastasierter LK wächst mit der LK-Größe, dann sollten die LK-Metastasen in den meisten Fällen zielsicher vom Präparator auch mit herkömmlichen Methoden entdeckt werden. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass eine hohe Anzahl untersuchter LK bei neueren Dissektionstechniken nicht mit einem Anstieg der Rate nodal-positiver Fälle einhergeht.

Eine effektive Immunantwort verbessert die Überlebenschance des Patienten. Als Zeichen der Aktivität bzw. Effizienz des Immunsystems vergrößert sich das peritumorale und regionäre Lymphsystem. Die vergrößerten LK sind einfacher auffindbar, der Umfang untersuchter Lymphknoten nimmt zu, und die bessere Prognose ist mittelbar auf die Immunantwort zurückzuführen. Die LK-Größe wäre dann ein Surrogatmarker für das Immunsystem [56, 58].

Deshalb stellt sich die Frage, ob die Bestimmung der LK-Größe oder davon abgeleiteter Parameter klinische Relevanz hat. Stellte sich heraus, dass die LK-Größe, unabhängig vom N-Status, auf die Überlebenskurve Einfluss nimmt, böte sich an, sie bei der klinischen Entscheidungsfindung miteinzubeziehen. Für nodal-negative Fälle konnte dieser Zusammenhang bereits nachgewiesen werden [59].

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zielsetzung**

Mittels vorliegender Daten und bemessener LK-Parameter wird die Hypothese aufgestellt, dass eine LK-Hyperplasie auch bei nodal-positiven Kolonkarzinom-Patienten einen günstigeren Verlauf bedingt. Diese LK-Parameter, Surrogatmarker für ein effektives Immunsystem, könnten im Rahmen des LK-Stagings erhoben werden und ermöglichten eine Einschätzung bezüglich der Prognose des Patienten.

Ziel der Arbeit ist es, die Hypothese an einem geeigneten Patientenkollektiv zu prüfen.

## **2.2 Patientenkollektiv, klinisch-pathologische Befunde**

Die Grundgesamtheit bestand aus nodal-positiven Kolonkarzinom-Fällen aus den Jahren 2002 bis 2004 und 2007 bis 2013. Fälle der Jahrgänge 2005/6 wurden bewusst nicht inkludiert, weil in diesem Zeitraum die Umstellung von der konventionellen auf neuere LK-Dissektionsverfahren erfolgte. Einschlusskriterien waren ein mit kurativer Zielsetzung operiertes Kolonkarzinom, ein positiver pN-Status (UICC Stadium III) und eine R0-Resektion. Ausschlusskriterien waren Karzinome des Rektums, Notfalloperationen, R1/2-Resektionen, chronisch entzündliche Darmerkrankungen und neuroendokrine Tumoren. Nach Ausschluss hatte das Patientenkollektiv einen Umfang von 234. Für die Überlebensanalysen wurden nur Fälle betrachtet, für die ein Mindestbeobachtungszeitraum von zwei Monaten gegeben war.

Klinisch-pathologische Basisinformationen (Alter, Geschlecht, Tumorstadium, Grading, N-Status, adjuvante Chemotherapie usw.) wurden aus der Patienten-Datenbank (ORBIS) des Klinikums Augsburg und dem Tumorregister Augsburg zusammengetragen. Alle pathologischen Befunde wurden in den Jahren 2002 bis 2013 von erfahrenen Pathologen des Instituts am Klinikum Augsburg gemäß der jeweils aktuellen TNM-Klassifikation und den WHO-Richtlinien erhoben.

Paraffinschnitte wurden für alle Fälle neu angefertigt, um den MMR-Enzym-Status auf immunhistochemischem Wege zu bestimmen. Folgende diagnostische Antikörper wurden hierzu verwendet: PMS2 (Clone EP51, ready to use), MSH6 (Clone EP49, ready to use). Für die Detektion der Reaktionen kam das OptiView®-System zum Einsatz. Alle Färbungen wurden auf einem vollautomatischen Immunfärbesystem durchgeführt. Benchmark Ultra®, Reagenzien und Geräte wurden von Roche/Ventana, Mannheim, Deutschland hergestellt und bezogen.

Die histologische Einteilung der Tumoren erfolgte durch eine erfahrene Fachärztin des Instituts der Pathologie des Klinikums Augsburg.

## 2.3 Metrische Analyse der Lymphknoten

Es wurden 6969 Lymphknoten an den aus dem Archiv entnommenen Paraffinschnitten (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) unter einem herkömmlichen Lichtmikroskop untersucht. Folgende Eigenschaften / Größen wurden evaluiert: Maximaler LK-Durchmesser (= LK-Größe), Tumorbefall des LK und, im Falle des Tumorbefalls, Ausmaß des intranodalen Tumoranteils. Alle metrischen Abmessungen am Lymphknoten wurden mittels einer am Mikroskop installierten Digitalkamera (ProgRes® C10 und C3, Jenoptik, Deutschland) unter Verwendung der Progres®-CapturePro-Software Version 2.10 und vorheriger Kalibrierung durchgeführt (Kamera und Software von Jenoptik, Jena, Deutschland).

## 2.4 Kategorien-Einteilung, MSR-Wert

Die LK eines einzelnen Falles wurden ihrer Größe nach in 11 Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe umfasste LK mit Durchmessern bis maximal 1 mm; die zweite bis maximal 2 mm usw. Der letzten Gruppe gehörten LK an, deren Durchmesser größer als 10 mm waren.

Größenkategorie	
1	$0 < \text{LK} \leq 1\text{mm}$
2	$1 < \text{LK} \leq 2\text{mm}$
3	$2 < \text{LK} \leq 3\text{mm}$
4	$3 < \text{LK} \leq 4\text{mm}$
5	$4 < \text{LK} \leq 5\text{mm}$
6	$5 < \text{LK} \leq 6\text{mm}$
7	$6 < \text{LK} \leq 7\text{mm}$
8	$7 < \text{LK} \leq 8\text{mm}$
9	$8 < \text{LK} \leq 9\text{mm}$
10	$9 < \text{LK} \leq 10\text{mm}$
>10	$\text{LK} > 10\text{mm}$

Nach Messung der intranodalen Tumoranteile konnte ein zentraler LK-Parameter erhoben werden. Dieser unter der Bezeichnung MSR (lymph node metastasis to lymph node size ratio) neu eingeführte Parameter ähnelt stark dem in der Fachliteratur [60-63] anerkannten LNR-Wert (Wörterverzeichnis), jedoch



berücksichtigt der MSR-Wert die LK-Größe. Der MSR-Wert wird fallspezifisch wie folgt berechnet:

$$\frac{\sum_{i=1}^m x_i}{\sum_{k=1}^n y_k}$$

( $x_i$  = max. Durchmesser des intranodalen Tumordinfiltrats in mm,  $m$  = Anzahl metastasierter LK pro Fall;  $y_k$  = max. LK-Durchmesser in mm,  $n$  = Gesamtzahl untersuchter LK pro Fall).

Ein (theoretischer) Quotient von 1.0 bedeutet somit kompletter Ersatz der LK-Histologie durch Tumorgewebe. Fälle mit einem MSR-Wert  $< 0.1070$  wurden der Gruppe 1 zugeteilt, solche  $> 0.1070$  der Gruppe 0. Fälle der Gruppe 1 weisen demnach eine geringere intranodale Tumorlast auf als Fälle der Gruppe 0.

Um die Gruppe 1 hinsichtlich der *absoluten* LK-Größen besser beurteilen zu können, wurde sie zweigeteilt, und zwar nach einem Einteilungsprinzip, welches bereits in anderen Arbeiten vorgestellt wurde [59, 64]. Hiermit wurden zwei Untergruppen, negativ und positiv, unterschieden, welche die Fälle mit wenigen, von Fällen mit einer Mindestzahl mittlerer bis großer LK trennten (Abb. 4, Wörterverzeichnis: LN5-Einteilung):

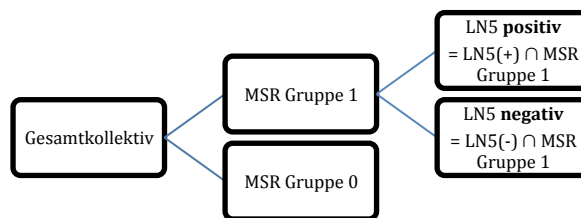


Abbildung 4: Unterteilung der Studiengruppen,  $\cap$  = Schnittmenge

## 2.5 Statistik

Für die Prüfung eines Zusammenhangs zweier Parameter wurde, unter Angabe des Korrelationskoeffizienten nach Pearson, die lineare Regressionsanalyse verwendet. Der Vergleich stetiger Merkmalsausprägungen erfolgte mit dem *Student t-Test* oder Rangsummentest nach Mann-Whitney. Bei binären Merkmalsausprägungen wurde mit dem Chi<sup>2</sup>-Vierfelderest gearbeitet. Mittelwerte sind mit +/- einer Standardabweichung angegeben. Schwellenwerte wurden mittels ROC-Kurven (*receiver operating characteristic*) berechnet. Zum Vergleich von Überlebenszeiten mehrerer Gruppen wurde der Logrank-Test verwendet, der sich insbesondere zur Untersuchung mitunter zensierter Daten eignet. Dessen Ergebnisse wurden graphisch durch Kaplan Meier-Kurven dargestellt. Zur multivariablen Analyse bei Überlebenszeiten wurde auf die Cox-Regression zurückgegriffen, die sich ebenfalls zur Untersuchung zensierter Daten eignet. Zur Berechnung des mittleren Beobachtungszeitraumes wurde das Verfahren nach Schemper/Smith herangezogen. Alle Berechnungen erfolgten mit Sigma Plot 13.0 (Systat, Richmond, Virginia). Die maximale Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  wurde bei  $\alpha = 5\%$  festgesetzt. Damit wurden p-Werte  $< 0.05$  als signifikant gewertet. Zur Beurteilung der Güte einer statistischen Kenngröße wurde, wenn möglich, ein 95% Konfidenzintervall (95%CI) angegeben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klinisch-pathologische Daten

Tabelle 2: *Klinisch-pathologische Daten*: (n = Schnittmenge)

	Gesamt- kollektiv n=234	MSR Gruppe 0, n=121	MSR Gruppe 1, n=113	p-Wert	LN5(+) n MSR Gr. 1 n=57	LN5(-) n MSR Gr. 1 n=56	p-Wert
Geschlecht, w:m	0.88:1	0.89:1	0.88:1	0.921	1.11:1	0.70:1	0.297
Alter, Mittel $\pm$ SD	68.5 $\pm$ 13	68 $\pm$ 13	69 $\pm$ 13	0.330	67 $\pm$ 15	70 $\pm$ 11	0.438
Insuffizienter pN- Status	31	26	5	<0.001	0	5	0.064
Untersuchte LK pro Patient, Mittel $\pm$ SD	30 $\pm$ 18	25 $\pm$ 16	34 $\pm$ 18	<0.001	40 $\pm$ 19	28 $\pm$ 16	<0.001
Befallene LK pro Patient, Mittel $\pm$ SD, Median	4 $\pm$ 6	6.68 $\pm$ 7.83; 5	1.80 $\pm$ 1.14; 1	<0.001	1.96 $\pm$ 1.20; 2	1.62 $\pm$ 1.0; 1	0.080
Gewöhnliches Adenokarzinom	191	91	100		49	51	
Anderer histologischer Typ	43	30	13	0.014	8	5	0.578
pT1/2 : pT3/4	23/211	7/114	16/97	0.054	4/53	12/44	0.054
pN1 : pN2	152/82	51/70	101/12	<0.001	51/6	50/6	0.785
Low grade : high grade	128/106	59/62	69/44	0.079	30/27	39/17	0.079
Fernmetastasen, M1:M0	71/163	72/49	91/22	<0.001	10/47	12/44	0.777
Rechtes Hemikolon	103	49	51		31	20	
Linkes Hemikolon	104	48	51	0.945	20	31	0.048
MMR intakt <sup>1</sup>	195	103	92		45	47	
MMR defizient <sup>1</sup>	30	11	19	0.147	10	9	0.966
Adjuvante Chemotherapie	147 <sup>2</sup>	79	68	0.236	35	33	0.937

<sup>1</sup>Keine Information bzgl. des MMR-Status bei insgesamt 9 Patienten <sup>2</sup>Keine Information bei 23 Patienten

Die klinisch-pathologischen Daten der Patienten und Tumoren sind in vorstehender Tabelle 2 aufgelistet. Unter Beachtung der Ausschlusskriterien blieben 234 Patienten für eine statistische Analyse übrig. Es handelte sich um 234 nodal-positive Fälle, die primär operativ, mit kurativer Intention, behandelt wurden. Das mittlere Alter betrug 68.5 ( $\pm$  13), 53% waren Männer. Bei einem mittleren Beobachtungszeitraum von 70 Monaten (Median: 65 Monate) ergab sich eine postoperative Gesamt-Mortalitätsrate von 54%. Im Mittel wurden je 30 LK ( $\pm$  18) untersucht. Der Durchschnitt hatte vier positive (= metastasierte) LK ( $\pm$  6). Insgesamt gab es 31 Fälle, die der empfohlenen Mindestzahl an untersuchten LK nicht genügten.

Auffällig sind die Zusammenhänge zwischen den MSR-Gruppen und den Kriterien Insuffizienter pN-Status, N-Stadium, Untersuchte LK pro Fall und Befallene LK pro Fall. Hier war MSR-Gruppe 0 durch mehr insuffiziente pN-Fälle (26 vs. 5) belastet, häufigeres Auftreten von mehr als 3 LK-Metastasen (pN2), weniger durchschnittlich untersuchte LK (25 vs. 34) und deutlich mehr LK-Metastasen pro Fall (6.68 vs. 1.80). Nach der dichotomen Aufteilung der 113 Fälle von MSR-Gruppe 1 in LN5 positiv und negativ, blieb das Ungleichgewicht der Anzahl untersuchter LK pro Fall bestehen [LN5(+)/(-): 40 vs. 28].

### 3.2 Lymphknoten

Insgesamt wurden 6969 LK untersucht, darunter 1011 Metastasen (14.5%). Abbildungen 5 und 6 zeigen die Größenverteilung der LK. Die mittlere Anzahl positiver LK pro Fall war 4.3 (Median 2.5, Spannweite: 1-61).

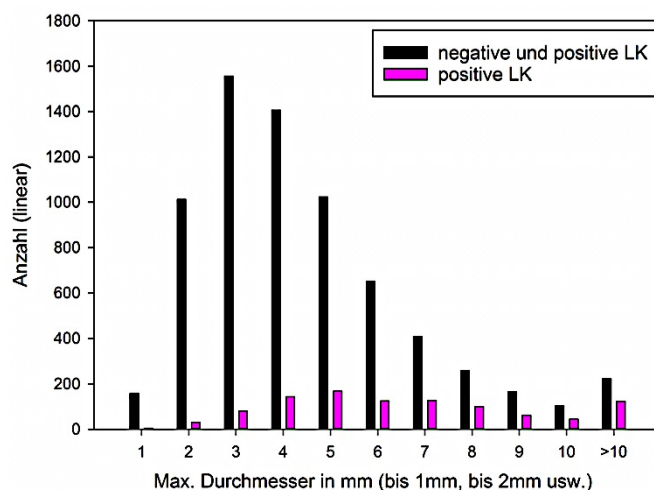


Abbildung 5: Größenverteilung der LK (n=6969). Ordinatenachse linear

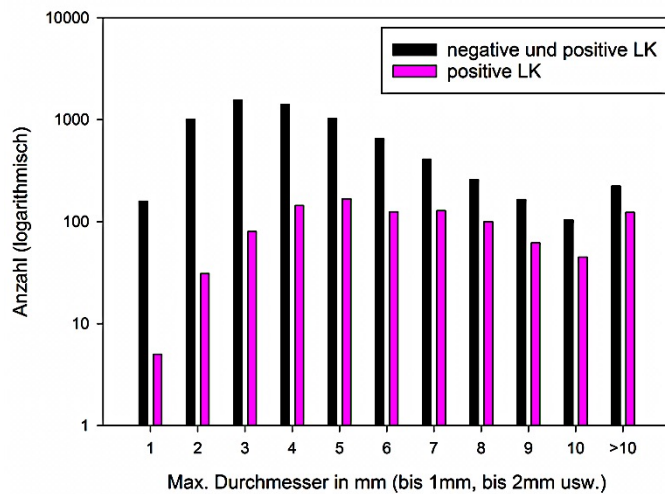


Abbildung 6: Größenverteilung der LK (n=6969). Ordinatenachse logarithmisch

Es ist den Abbildungen 5 und 6 zu entnehmen, dass von den 6969 untersuchten LK der Schwerpunkt der Verteilung in der Größenordnung zwischen  $> 1$  und  $\leq 6$  mm lag. Der Anteil  $> 10$  mm großer LK bei nur positiven LK war jedoch ausgeprägter als bei den negativen und positiven (12.2% vs. 3.2%). Die verbreitete Annahme, metastasierte LK seien immer groß, ist durch den 51%igen Anteil zwischen 2 und 6 mm messender LK an allen positiven LK in Frage gestellt. Die mittlere Größe positiver LK lag bei  $5.7 \pm 3.4$  mm (Median: 5.24 mm), die der nicht befallenen LK bei  $4.4 \pm 1.1$  mm (Median: 4.14 mm,  $p < 0.001$ , Abb.7).

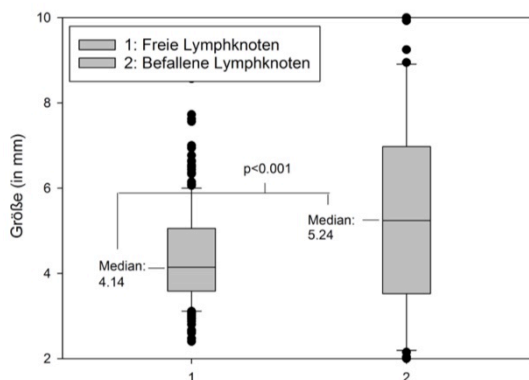


Abbildung 7: Vergleich der Größen positiver und negativer LK. Abszissenachse: 1: Freie (nicht befallene) LK, 2: Befallene LK

In den Abbildungen 8 und 9 werden die Anzahl der Fälle mit bestimmten Größen positiver LK bzw. die größten positiven LK pro Fall dargestellt. Die Auszählung ergab, dass bei nur 4 Fällen metastasierte LK < 1 mm entdeckt wurden (Abb. 8). Bei 91 Fällen fanden sich positive LK der Größenkategorie 5 ( $4 \text{ mm} < \text{LK} \leq 5 \text{ mm}$ ), bei 76 Fällen der Größenkategorie > 10 mm. Abbildung 9 zeigt deutlich, dass bei keinem einzigen Fall der größte aufgefundene metastasierte LK < 2 mm war. So wurden beim Auffinden kleiner LK-Metastasen bei dem gleichen Patienten in der Regel auch noch größere gefunden.

Abbildung 10 zeigt den prozentualen Anteil positiver LK als Funktion der Größenkategorie. Der Anteil positiver LK an bestimmten Größenkategorien stieg mit der Größenkategorie (fast) monoton an. Während nur 3% der Größenkategorie 2 befallen waren, waren es schon 19.2 % bzw. 55.2 % der Größenkategorien 6 bzw. >10. Das heißt, dass die Hälfte der > 10 mm großen LK tumorös infiltriert waren.

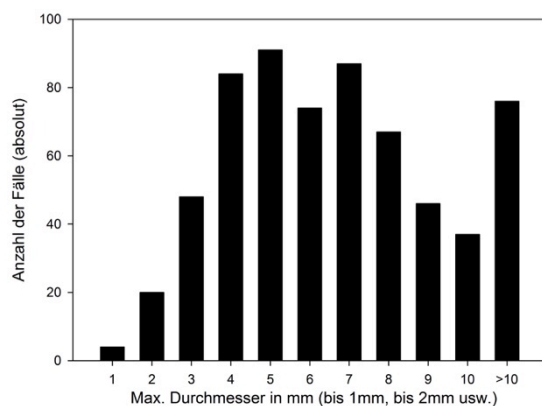


Abbildung 8: Anzahl der Fälle mit bestimmten Metastasengrößen.

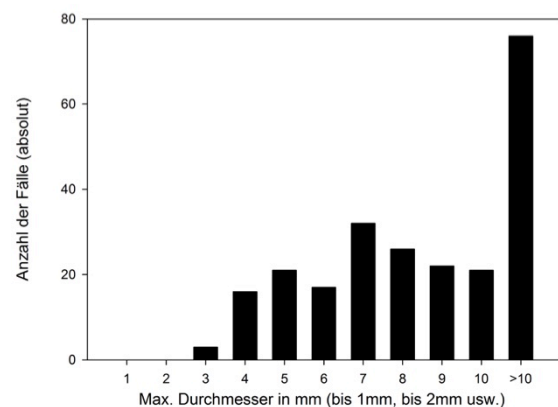


Abbildung 9: Die größten LK-Metastasen pro Fall.  
Erklärung: Anzahl der Fälle, bei denen die größte LK-Metastase höchstens 1mm (2mm, 3mm usw.) war.

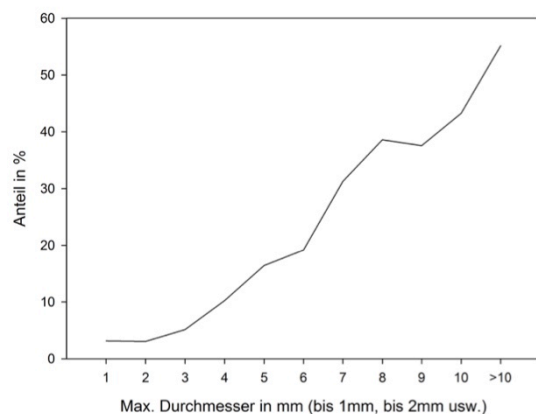


Abbildung 10: Anteil positiver LK an bestimmten Größenkategorien

### 3.3 Welche Faktoren beeinflussen die Anzahl aufgefundener LK?

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen, welche sich mit dem Zusammenhang zwischen bestimmten Faktoren und der Anzahl aufgefundener LK beschäftigen, vorgestellt.

LN5 korrelierte mit der Anzahl aufgefundener LK (Abb. 11: Links):  $32.8 \pm 19.6$  LK (Median: 29 LK) vs.  $25.7 \pm 14.7$  LK (Median: 23 LK),  $p = 0.007$ . Die LK-Größe wurde hier anhand der Anzahl  $> 5\text{mm}$  großer LK (LN5, siehe Wörterverzeichnis) bemessen. Der MMR Enzym-Status konnte als zweiter Faktor identifiziert werden (Abb. 11: Rechts). Bei MMR-defizienten Tumoren konnten in der Regel mehr LK untersucht werden als bei MMR-intakten:  $36.6 \pm 18.8$  LK (Median: 33 LK) vs.  $29.2 \pm 17.6$  LK (Median: 25 LK),  $p = 0.017$ .

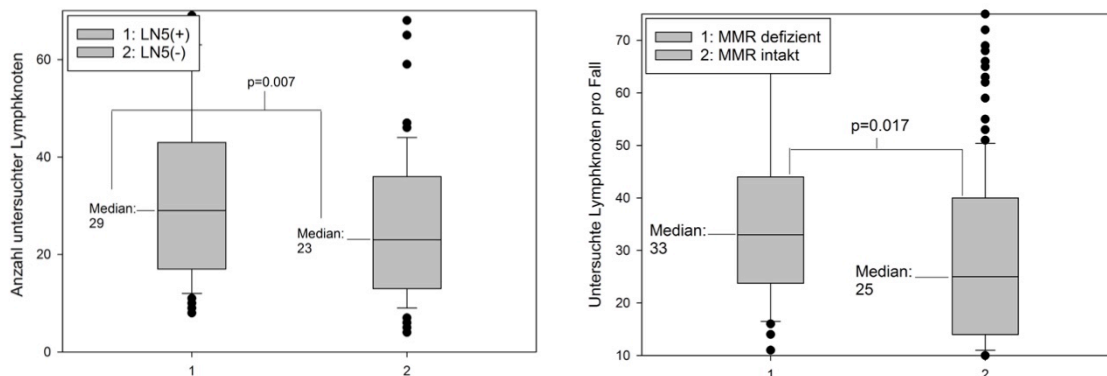


Abbildung 11: Links: LK-Größe und Anzahl untersuchter LK pro Patient, Abszissenachse: 1: LN5(+), 2: LN5(-); Rechts: MMR Enzym-Status und Anzahl untersuchter LK pro Patient, Abszissenachse: 1: MMR defizient, 2: MMR intakt.

Folgende Faktoren standen in keinem statistisch signifikanten Zusammenhang mit der Anzahl aufgefundener LK: Patientenalter ( $< 60$  J. /  $> 60$ J:  $32.7 \pm 17.8$  LK vs.  $28.9 \pm 18.0$  LK,  $p = 0.096$ ), Tumorlokalisation (rechtes / linkes Hemikolon:  $31.3 \pm 18.1$  LK vs.  $28.3 \pm 17.8$  LK,  $p = 0.152$ ), T-Stadium (T1/2 bzw. T3/4:  $23.6 \pm 11.6$  LK vs.  $30.5 \pm 18.4$  LK,  $p = 0.155$ ). Der Umfang n der Gruppe T1/2 war mit  $n = 23$  ungleich kleiner als bei T3/4 mit  $n = 211$ . Möglicherweise ist dies ein Grund für die Verfehlung der statistischen Signifikanz.

### 3.4 Welche Faktoren beeinflussen die LK-Größe?

Es soll vorab untersucht werden, welche Faktoren die LK-Größe ausmachen.

Die LK-Größe wurde hier (indirekt) anhand der Anzahl > 5mm großer LK (LN5, siehe Wörterverzeichnis) bemessen. Die nachfolgenden Werte entsprechen daher der (mittleren) Anzahl der LN5-Lymphknoten pro Fall.

Der MMR Enzym-Status zeigte sich als größenrelevant (MMR defizient / intakt:  $10.1 \pm 7.4$  vs.  $7.3 \pm 5.5$ ,  $p = 0.045$ ), ebenso die Tumorlokalisation (rechtes / linkes Hemikolon:  $9.6 \pm 6.1$  vs.  $5.9 \pm 4.7$ , Medianwerte: 8 vs. 5,  $p < 0.001$ ; Abb. 12) und die nodale Positivität ( $p < 0.001$ , Abb. 7, Seite 25). Das T-Stadium ließ sich nicht auf dem 5%-Niveau absichern (T1/2 bzw. T3/4:  $5.4 \pm 2.7$  vs.  $8.0 \pm 6.0$ ,  $p = 0.057$ ). Auch an dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass der Umfang n der Gruppe T1/2 mit  $n = 23$  ungleich kleiner war als bei T3/4 mit  $n = 211$ .

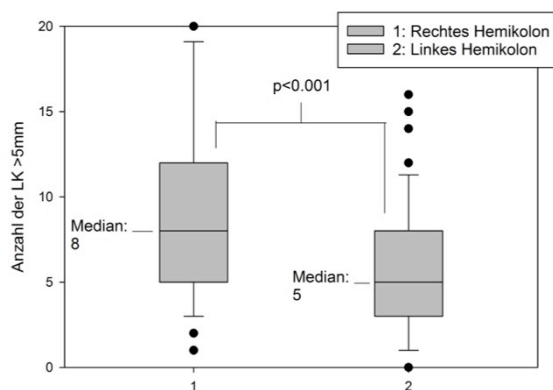


Abbildung 12: Zusammenhang zwischen Tumorlokalisation und LK-Größe. LK-Größe gemessen an Anzahl der LK >5mm (LN5). Abszissenachse: 1: Rechtes Hemikolon, 2: Linkes Hemikolon.

Außerdem war die LK-Positivität mit der LK-Größe assoziiert (Abb. 7 Seite 26; positive / negative LK:  $5.7 \pm 3.4$  mm vs.  $4.4 \pm 1.1$  mm,  $p < 0.001$ ).



### 3.5 Prognostische Relevanz von LK-Parametern

Die folgenden Variablen wurden hinsichtlich ihrer prognoserelevanten Aussagekraft geprüft: Anzahl untersuchter LK pro Fall, LN5-Status und MSR-Wert.

Die Anzahl untersuchter LK pro Fall zeigte einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben (Median von 104 Monaten, 95%CI 51 - 157; vs. 42 Monate, 95%CI 28 - 56,  $p = 0.003$ , Abb.13). Für das Erstellen einer Kaplan Meier-Kurve mussten die zwei Gruppen mittels eines Schwellenwertes unterteilt werden, welcher mit einer ROC-Kurve bestimmt wurde. Die ROC-Kurven-Analyse ergab einen optimalen Schwellenwert, der bei 30 LK lag.

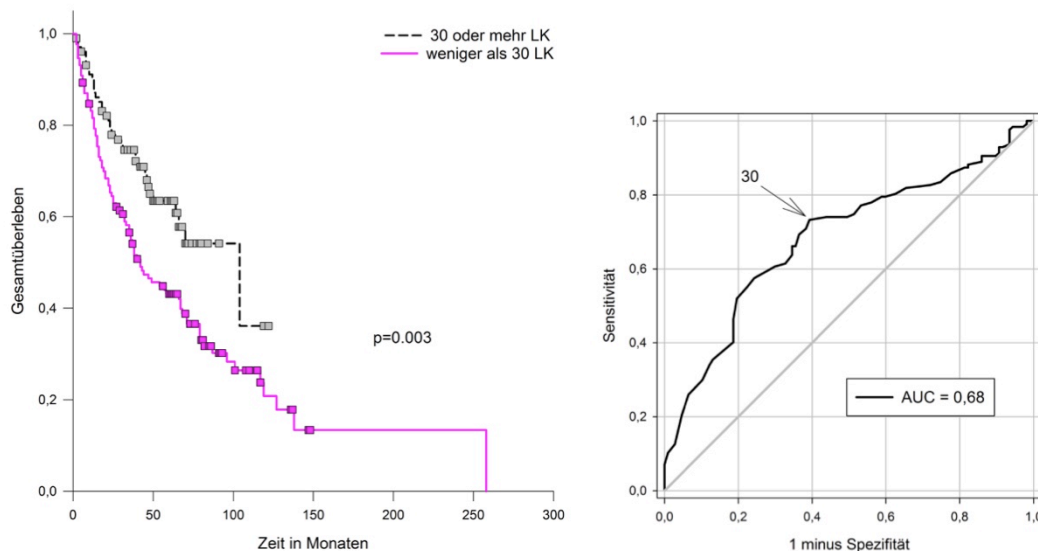


Abbildung 13: Kaplan Meier-Kurve (links): Prognostischer Effekt der Anzahl untersuchter LK pro Fall. ROC-Kurve (rechts): Zur Berechnung des Schwellenwertes, der in zwei Gruppen unterteilt (30 oder mehr LK bzw. weniger als 30 LK). LK = Lymphknoten, AUC = area under the curve

Mit demselben Schwellenwert (30 LK) konnte darüber hinaus ein positiver Effekt der LK-Anzahl auf das Gesamtüberleben in der Subgruppe chemotherapierter Patienten gezeigt werden (Median von 104 Monaten, 95%CI 40 - 167; vs. 42 Monate, 95%CI 20 - 64,  $p = 0.013$ , Abb. 14).

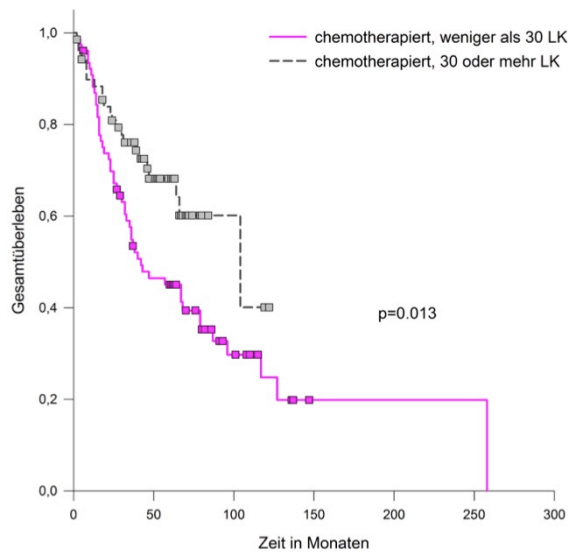


Abbildung 14: Kaplan Meier-Kurve: Prognostischer Effekt der Anzahl untersuchter LK pro Fall. Hier nur Patienten, die chemotherapiert wurden.

Der Faktor LN5 allein war bei diesem Fallkollektiv nicht prognoserelevant (Median von 66 Monaten, 95%CI 49 - 83; vs. 66 Monate, 95%CI 39 - 93,  $p = 0.837$ , Abb. 15).

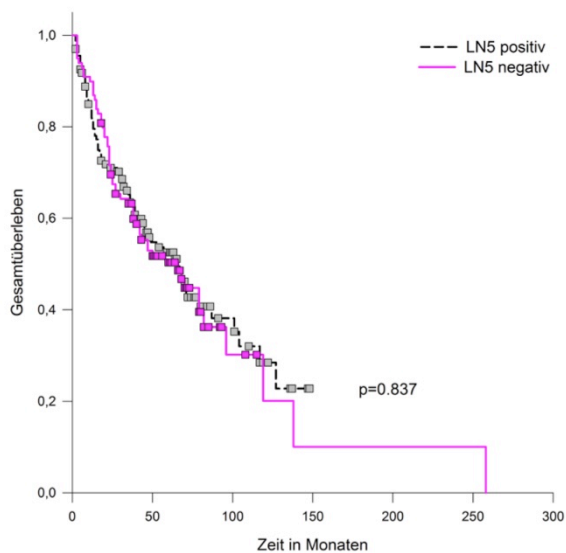


Abbildung 15: Kaplan Meier-Kurve: Prognostischer Effekt von LN5 auf das Gesamtüberleben. LN5 positiv: 7 oder mehr LK >5mm, LN5 negativ: Weniger als 7 LK >5mm

Der MSR-Wert jedoch war prognoserelevant. Fälle mit einem MSR-Wert  $< 0.1070$  unterschieden sich statistisch signifikant von Fällen mit größeren Werten durch ein längeres Gesamtüberleben (Median von 79 Monaten, 95%CI 54 - 103; vs. 38 Monaten, 95%CI 25 - 50,  $p < 0.001$ , Abb. 16).

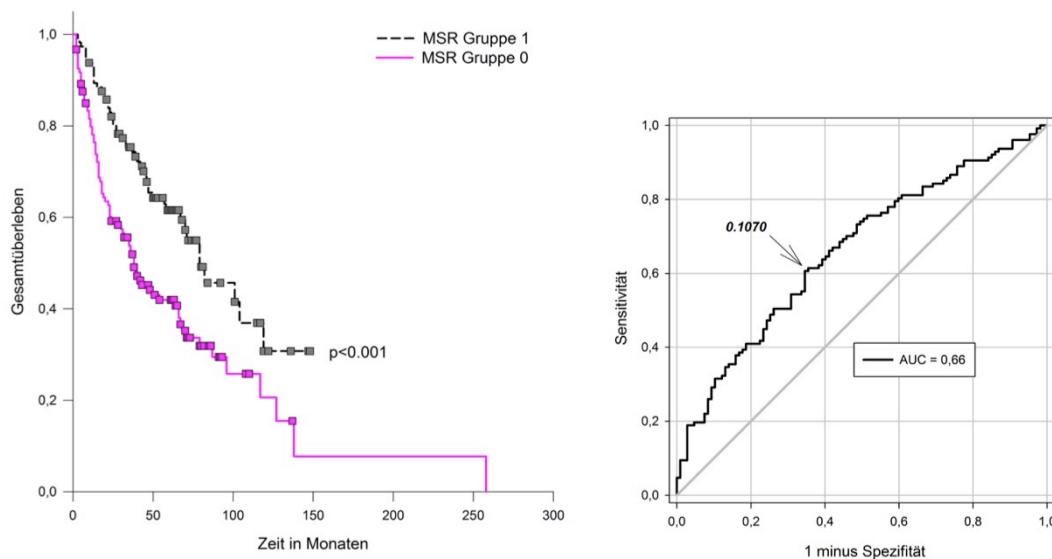


Abbildung 16: Kaplan Meier-Kurve (links): Prognostischer Effekt von MSR auf das Gesamtüberleben. ROC-Analyse (rechts): Zur Bestimmung des Schwellenwertes von 0.1070. MSR = lymph node metastasis to lymph node ratio, AUC = area under the curve

Obwohl der MSR-Wert die individuellen LK-Größen schon berücksichtigt (im Nenner des Bruchs), musste eine weitere Unterteilung erfolgen, um Fälle mit gleichem Quotient, aber unterschiedlich großen LK, auseinander zu halten. Die Skizze (Abb. 17) soll den Problemfall an einem Beispiel verdeutlichen:

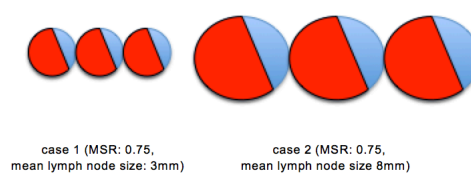


Abbildung 17: Zwei Fälle mit gleichem MSR-Wert, aber unterschiedlich großen LK.  
Mean lymph node size = Mittlere LK-Größe

Deshalb wurde die Aufspaltung der MSR-Gruppe 1 in LN5 positiv und negativ vorgenommen. Unter den MSR-Gruppe-1-Fällen war der Faktor LN5 prognoseweisend (Abb. 18). Man kann erkennen, dass diejenige Gruppe (MSR-Gruppe 1) mit einer Mindestzahl (= 7) mittlerer bis großer LK im Vergleich zur anderen einen Überlebensvorteil besaß (mittleres Überleben von 104 Monaten, 95%CI 86 - 122; vs. 66 Monaten, 95%CI 54 - 77,  $p = 0.014$ ).

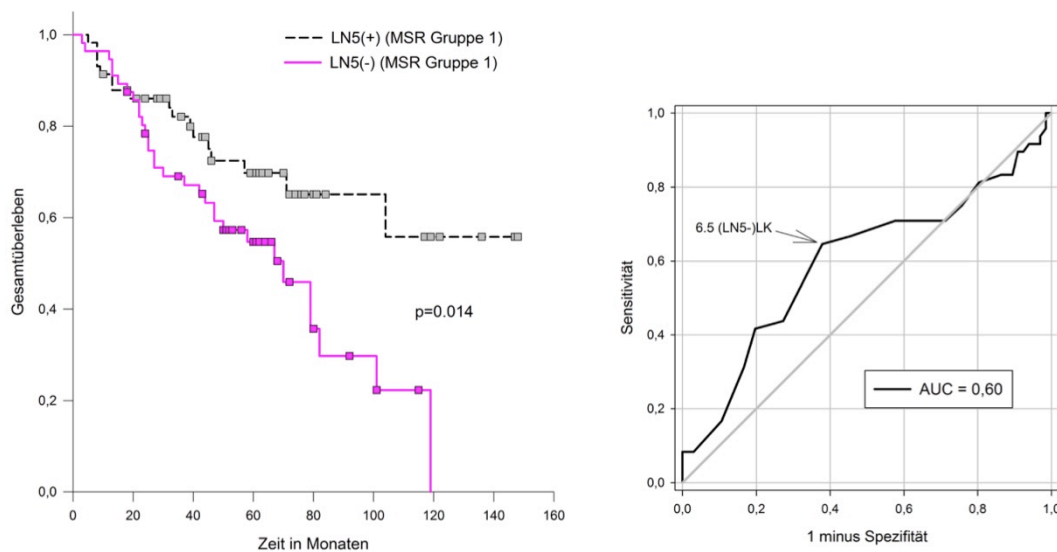


Abbildung 18: Kaplan Meier-Kurve (links): Prognostischer Effekt von LN5 auf das Gesamtüberleben bei Fällen, die der MSR-Gruppe 1 angehören. ROC-Analyse (rechts): Zur Bestimmung des Schwellenwertes von 6.5. LN5 = LK>5mm, AUC = area under the curve

Der Median-Wert der Gruppe LN5(-) lag bei 70 Monaten (95%CI 49 - 91), Gruppe LN5(+) erreichte den Median-Wert nicht (siehe Abb. 18), weshalb die jeweiligen Mittelwerte genannt wurden.

Zur Unterscheidung zwischen LN5(+) und LN5(-) wurde der Schwellenwert 7 (positiv:  $\geq 7$  LK > 5 mm, negativ:  $< 7$  LK > 5 mm) nicht unreflektiert von früheren Arbeiten übernommen, sondern separat durch eine ROC-Analyse bestimmt (Abb. 18 rechts). Diese lieferte einen zur Diskriminierung optimalen Schwellenwert von 6.5 (LN5-)Lymphknoten, der der Zahl 7 gleichkommt. Zur Veranschaulichung des Unterschiedes zwischen den absoluten LK-Größen der beiden Gruppen LN5(+) und LN5(-) wurden deren mittleren LK-Größen gegenübergestellt (Abb. 19). Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht nur durch ihre Zahl an LK > 5 mm, sondern auch durch ihre mittleren LK-Größen: 5.0 vs. 4.0 mm,  $p < 0.001$  (Median: 4.85 vs. 3.95).

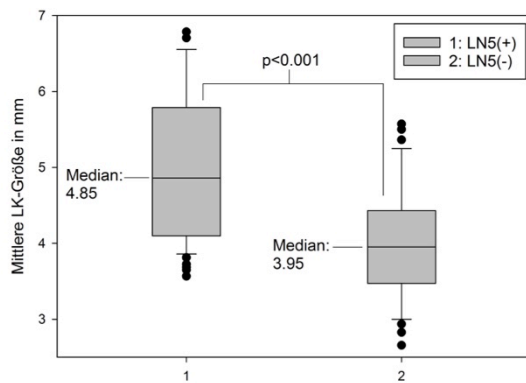


Abbildung 19: Vergleich der mittleren LK-Größen der Gruppen LN5(+) und LN5(-). Alle Fälle gehören der MSR-Gruppe 1 an.

Die lineare Regressionsanalyse zeigt den Zusammenhang zwischen MSR-Wert und der Anzahl befallener LK. Mit dem MSR-Wert stieg die Anzahl befallener LK an (Pearson-Korrelationskoeffizient  $R = 0.606$ , Abb. 20).

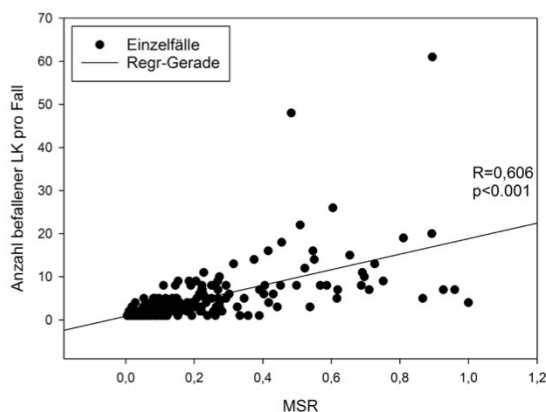


Abbildung 20: Regressionsanalyse und -gerade. Abhängigkeit zwischen MSR-Wert und der Anzahl befallener LK pro Fall.

### 3.6 Multivariable Analyse

Es wurde die Unabhängigkeit der Variablen MSR-Wert und LN5  $\cap$  MSR-Wert bezüglich der das Überleben betreffenden Aussagekraft mit der Cox-Regression geprüft. Zur Klärung der Frage, welche Einflussfaktoren im multivariablen Modell Berücksichtigung finden sollten, wurde vorab für jeden einzelnen Faktor eine univariable Analyse (mittels Kaplan Meier-Analyse) durchgeführt. So konnte eine Vorauswahl getroffen werden. Diese Vorauswahl sollte nicht nur statistischen

Bedingungen, sondern auch inhaltlich sinnvollen Überlegungen genügen. Deshalb wurden Fernmetastasen im Vorhinein nicht in die Analyse aufgenommen, da die prognostische Gewichtung von deren Präsenz dermaßen groß ist, dass alle anderen Faktoren in deren Schatten hätten treten müssen.

Tabelle 3: Uni- und multivariable Analyse

	Kaplan Meier-Analyse (univariat)	Ergebnis (univariaten) Kaplan Meier- Analyse	Ergebnis der (multivariat) <b>p-Wert; Hazard Ratio</b>	Cox-Regression <b>(95%CI)</b>
MSR-Wert	Siehe Abb. 16 (3.5)	p<0.001	p=0.405	1.225 (0.760-1.973)
LN5(+) $\cap$ MSR-Gruppe 1	Siehe Abb. 18 (3.5)	p=0.014	p=0.005	2.440 (1.314-4.525)
Insuffizienter pN-Status	Abb. 21	p=0.003	p=0.208	1.371 (0.839-2.240)
Anzahl untersuchter LK pro Patient	Abb. 22	p=0.009	p=0.052	1.508 (0.996-2.288)
Tumorhistologie	Abb. 23	p=0.525		
T-Stadium	Abb. 24	p=0.015	p=0.016	2.506 (1.186-5.291)
N-Status	Abb. 25	p<0.001	p=0.002	1.940 (1.273-2.954)
Grading	Abb. 26	p=0.005	p=0.003	1.739 (1.214-2.488)
Tumorlokalisation	Abb. 27	p=0.073		
MMR Enzym-Status	Abb. 28	p=0.081		
Adjuvante Chemotherapie	Abb. 29	p=0.665		

95%CI (95% Konfidenzintervall)

Die Kaplan Meier-Kurven sind im Folgenden abgebildet (Abbildungen 21-29); die Ergebnisse in Tabelle 3 zusammengestellt. Als prognostisch relevant zeigten sich der insuffiziente pN-Status, die Anzahl untersuchter LK pro Patient, das T-Stadium, der N-Status und das Grading, nicht jedoch die Tumorlokalisation und -histologie, MMR Enzym-Status oder Chemotherapie. Der MMR Enzym-Status verfehlte nur knapp die statistische Signifikanz ( $p = 0.081$ ).

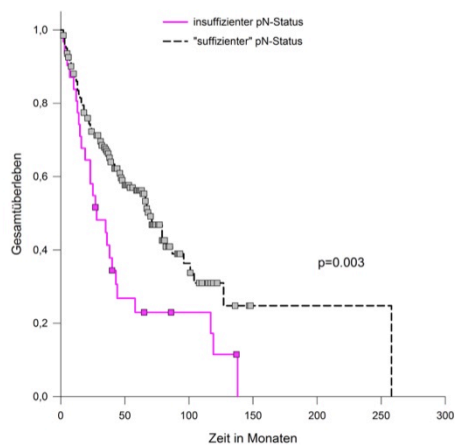


Abbildung 21: Insuffizienter pN-Status

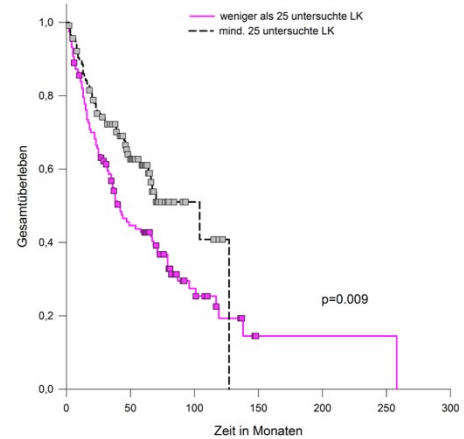


Abbildung 22: Anzahl untersuchter LK

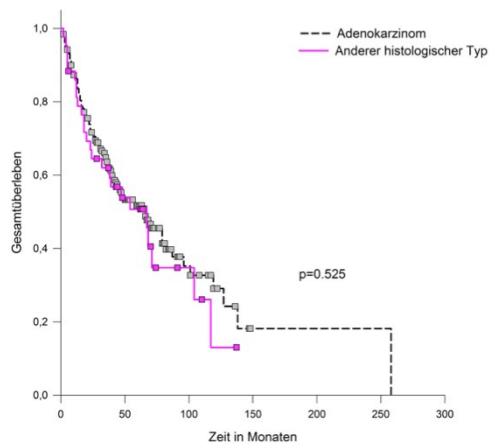


Abbildung 23: Tumorsthistologie

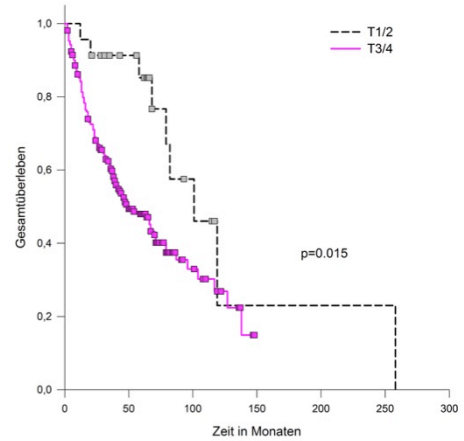


Abbildung 24: T-Stadium

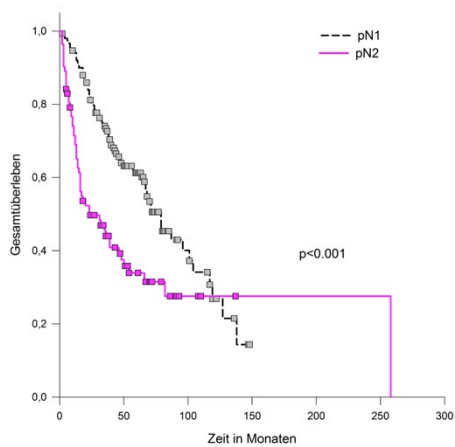


Abbildung 25: N-Status

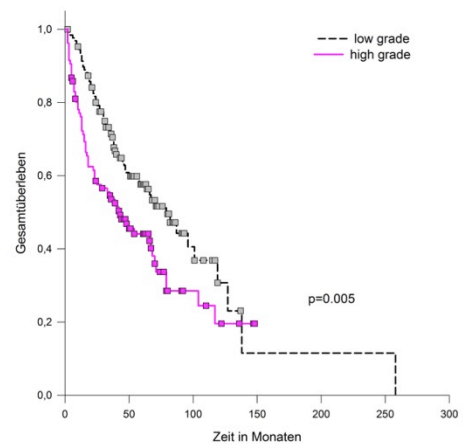


Abbildung 26: Grading

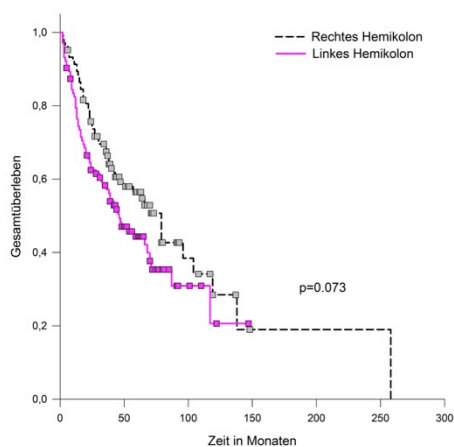


Abbildung 27: Tumorlokalisation

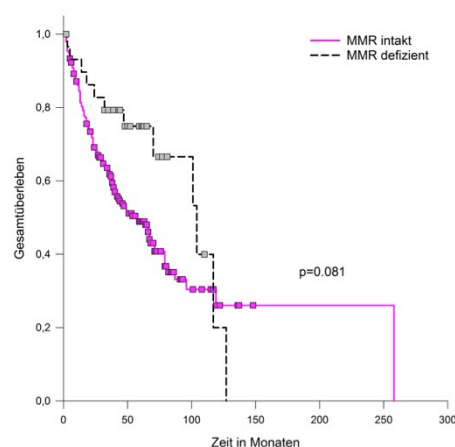


Abbildung 28: MMR Enzym-Status

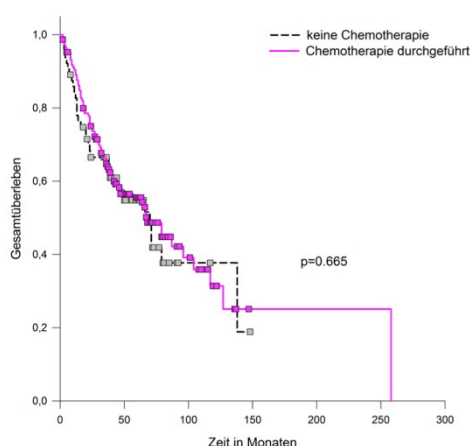


Abbildung 29: Adjuvante Chemotherapie

In die Cox-Regression gingen daher neben den beiden Studiengruppen mit ein: Insuffizienter pN-Status, Anzahl untersuchter LK pro Patient, T-Stadium, N-Status und Grading.

Die Größen  $LN5(+)$   $\cap$  MSR-Wert, T-Stadium, N-Stadium und Grading gingen als unabhängige Variablen aus der Analyse heraus. Damit lieferte das multivariable Modell den Hinweis, dass diese Größen die Zielgröße (Überleben) direkt kausal beeinflussen. Alle anderen Größen erreichten nur p-Werte jenseits der 0.05-Grenze und sind daher mit dem Überleben wahrscheinlich nur indirekt assoziiert. Alle Größen wurden als nominalskalierte Merkmale in der Cox-Regression verrechnet.



### 3.7 Risikofaktoren für das Auftreten von Fernmetastasen

Abschließend wurden die Risikoverhältnisse (odds ratio) für alle aus 3.6 relevanten Parameter (MSR-Wert, insuffizienter pN-Status, Anzahl untersuchter LK, T-Stadium, N-Status, Grading) bezüglich des Auftretens von Fernmetastasen berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Risikoverhältnisse

	odds ratio	p-Wert	95%CI
MSR-Wert	2.815	<0.001	1.560-5.080
Insuffizienter pN-Status	4.598	<0.001	2.090-10.115
Anzahl untersuchter LK	2.040	0.019	1.156-3.601
T-Stadium	5.102	0.032	1.163-22.383
N-Status	2.020	0.023	1.138-3.587
Grading	0.987	0.923	0.564-1.728

95%CI (95% Konfidenzintervall)

Dieses Patientenkollektiv betreffend können folgende Aussagen abgeleitet werden: Die Wahrscheinlichkeit, dass Fernmetastasen auftreten, war bei der MSR-Gruppe 0 fast 3-mal so hoch wie bei Gruppe 1. Analog lassen sich die Ergebnisse für die anderen Parameter anwenden. Es waren die Ereignis-Wahrscheinlichkeiten (Auftreten von Fernmetastasen) unter fast allen angeführten Parametern höher als bei deren Negativ-Gruppen. Nur das Grading zeigte keinen Unterschied im Risikoverhältnis. Besonders hoch waren die odds ratios für den insuffizienten pN-Status und das T-Stadium. So war beispielsweise die Wahrscheinlichkeit für Fernmetastasen bei pT3- und pT4-Fällen 5-mal so hoch wie unter pT1- und pT2-Fällen.

## 4 Diskussion

Dass das (postoperative) Lymphknoten-Staging des Kolonkarzinoms eine übergeordnete Rolle beim Diagnose- und Therapieentscheid spielt, ist unumstritten. Besondere Beachtung findet hier das Vorhandensein von LK-Metastasen. Ebenfalls von Bedeutung ist die Anzahl etwaiger LK-Metastasen. Zusammen ergibt dies den pN-Status. Der LK-Größe wurde hingegen beim Staging bislang nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Im Sinne einer Fortführung von bereits zu diesem Thema veröffentlichten Studien knüpft die vorliegende Arbeit an die Untersuchung der LK-Größe und prognostischer Zusammenhänge an und möchte zur Vervollständigung der Datenlage auch bei nodal-positiven Fällen beitragen. Die Bewertung der Ergebnisse aus dem vorangegangenen Kapitel und der Vergleich mit den Befunden anderer Autoren werden sich in ähnlicher Reihenfolge der Ergebnisse aus den Abschnitten 3.1 bis 3.7 anordnen.

6969 LK, darunter 1011 Metastasen (14.5%), von 234 Fällen nodal-positiver Kolonkarzinome wurden mikroskopisch untersucht. Dass pro Fall im Mittel 30 LK (Median: 25) untersucht wurden (bei einer insuffizienten pN-Rate von 13%), spricht für die Aussagekraft der Arbeit, weil nur so ein breites Spektrum möglicher LK-Größen ausgearbeitet werden konnte. Zum Vergleich: Bezogen auf den Anteil insuffizienter pN-Einstufungen entspricht das einer relativen Verbesserung um fast 400% verglichen mit Johnson's Ergebnissen aus dem Jahr 2002, in dessen Studie bei nur 22.4% 12 oder mehr LK untersucht wurden [22] (siehe Abschnitt 1.7.1).

### 4.1 Über metastasierte LK und deren Größe

Sind metastasierte LK immer groß und große LK immer metastasiert? Die meisten LK waren  $> 1$  mm und  $< 6$  mm groß (Abb. 5 und 6, Seite 25 und 26). Dies ist konsistent mit den Ergebnissen von Märkl et al. [64] sowie von Rössler et al. [65]. Im Vergleich waren metastasierte LK etwas größer als nicht metastasierte LK:  $5.7 \pm 3.4$  mm vs.  $4.4 \pm 1.1$  mm (Abb. 7, Seite 26). Sloothak et al. und Rössler et al. kamen

diesbezüglich zu vergleichbaren Ergebnissen (Rössler: mittlere Größe positiver vs. negativer LK:  $5.6 \pm 1.9$  mm vs.  $3.6 \pm 0.8$  mm) [65, 66]. Die Größenunterschiede sind allerdings nicht allzu sehr ausgeprägt. Mit anderen Worten: Metastasierte LK waren nicht ausschließlich unter den großen LK zu finden. Sie betrafen alle Größenkategorien, jedoch mit jeweils unterschiedlicher Gewichtung: Der Anteil positiver LK wuchs (fast) monoton mit der Größenkategorie (Abb. 10, Seite 27). Abbildung 10 wurde hier des Vergleiches wegen nochmal aufgeführt. Neben Abbildung 10 sind die Ergebnisse von Rössler et al. dargestellt, ebenfalls als Funktion der Größenkategorie (Abb. 30).

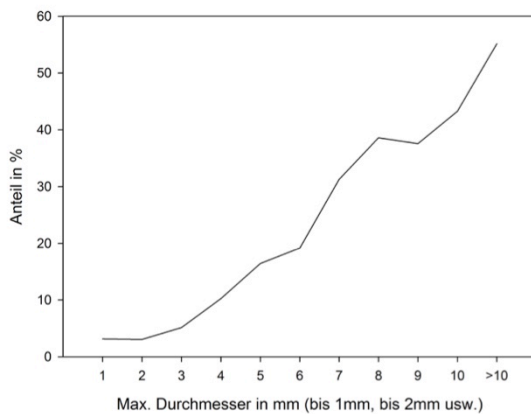


Abbildung 10 (aus Abschnitt 3.2): Anteil positiver LK an bestimmten Größenkategorien

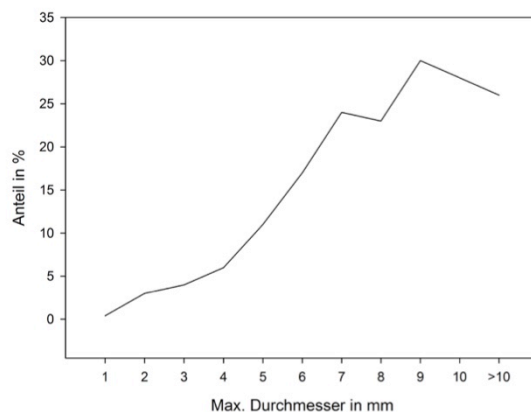


Abbildung 30: Anteil positiver LK an bestimmten Größenkategorien, berechnet nach den Ergebnissen von O. Rössler [65].

Auch wenn mit der LK-Größe die Wahrscheinlichkeit, eine Metastase zu finden, stieg, bleibt festzuhalten, dass 51% aller aufgefundenen metastasierten LK in den Kategorien 2 bis 6 mm angesiedelt waren. 45% der LK > 10 mm waren tumorfrei. Bei Märkl et al. bzw. Rössler et al. waren es sogar 72% bzw. 74% [64, 65]. Zusammenfassend kann man sagen, dass die LK-Größe allein kein zuverlässiger Metastasen-Prädiktor ist.

In die gleiche Richtung zeigen auch die unzulänglichen Ergebnisse der bildgebenden Verfahren auf diesem Gebiet: Das präoperative LK-Staging (Ultraschall, CT, MRT) fußt hauptsächlich auf der LK-Größe. Wenn man bedenkt, dass ein Großteil der Metastasen eben nicht größer als 10 mm ist und zwischen 45 und 74% der großen (> 10 mm) LK tumorfrei sind, dann muss man mit Einbußen der Sensitivität und Spezifität dieser Verfahren rechnen. In der Studie von Sauer et al. kam es, im Rahmen präoperativer Diagnostik (endorektaler Ultraschall beim

Rektumkarzinom), zu einem Overstaging in 18% der Fälle [67]. Umgekehrt schildern Guillem et al. den Fall, dass bei 22% der Patienten, die präoperativ als T3N0 eingestuft wurden, im Operationspräparat okkulte LK-Metastasen gefunden werden konnten [68].

## **4.2 Die LK-Größe und damit zusammenhängende Parameter**

Mit der Anzahl aufgefundener LK und LK-Metastasen haben sich zahlreiche Autoren vielfach beschäftigt; auch mit dem Verhältnis aus beiden (LNR, Wörterverzeichnis). Dünn ist hingegen die Datenlage bezüglich der LK-Größe und ihrer Relevanz. Aber warum ist es sinnvoll, das Interesse auf die LK-Größe zu lenken?

Erstens hängt das präoperative LK-Staging in besonderem Maße von der LK-Größe ab und zweitens bedeuten größere LK auch mehr untersuchte LK, weil diese bei der Präparation einfacher zu finden sind. Mit mehr untersuchten LK gelangt man schließlich zum bekannten Zusammenhang zwischen LK-Anzahl und Prognose.

In der Arbeit von Rössler et al. mit Schwerpunkt LK-Größe identifizierten die Autoren einzelne Faktoren, die Einfluss diesbezüglich nehmen: LK-Positivität (mittlere Größe positiver vs. freier LK:  $5.6 \pm 1.9\text{mm}$  vs.  $3.6 \pm 0.8\text{mm}$ ), Tumorlokalisation, T-Stadium, Größe des Primärtumors und MMR Enzym-Status. Eine ausgeprägte antitumoröse lymphozytäre Reaktion, definiert nach den Kriterien, die Ogino et al. beschrieben hatten [69], erzielte im Vergleich mit den anderen Faktoren sogar die höchste hazard ratio bezüglich der LK-Größe, verfehlte jedoch in der multivariablen Testung knapp das 0.05-Niveau ( $p = 0.053$ ) [65]. Angesichts eines der statistischen Signifikanz sehr nahen p-Wertes, darf wohl von einem Zusammenhang ausgegangen werden, der sich vielleicht aufgrund des begrenzten Stichprobenumfangs ( $n = 148$ ) nicht absichern ließ. Diesen Zusammenhang, nämlich zwischen Marker einer lokalen Immunantwort und der LK-Größe, konnten auch Märkl et al. nachweisen; und zwar als positive Korrelation zwischen der Zahl intratumoraler T-Lymphozyten (ITL) und der LK-Größe [56].

Die Untersuchungen am eigenen Fallkollektiv und deren Befunde stimmen in großen Teilen damit überein. Es konnten ebenfalls LK-Positivität (Abb. 7, Seite 26), Tumorlokalisation (Abb. 12, Seite 29) und MMR Enzym-Status als mit der LK-Größe korrelierende Faktoren identifiziert werden, nicht aber das T-Stadium ( $p = 0.057$ ), bei dem allerdings die zu vergleichenden Gruppen (T1/2 und T3/4) nicht gleich gewichtet waren (T1/2 mit  $n = 23$ , T3/4 mit  $n = 211$ ). Zu den Markern einer lokalen Immunantwort (z.B. ITL) und deren Effekt können keine Aussagen gemacht werden, da die Prüfung dieser Parameter nicht Teil der vorliegenden Studie war.

### 4.3 Die Anzahl aufgefundener Lymphknoten

Je mehr LK vom Pathologen untersucht werden, desto besser fällt die Prognose aus. Dieser positive Zusammenhang wurde vielfach bestätigt. Auch anhand des hier untersuchten Fallkollektives konnte eine solche LK-Anzahl-Prognose-Relation gezeigt werden (Abb. 13, Seite 30). Das Phänomen wurde sowohl beim Kolonkarzinom Stadium I/II [26-32], als auch beim Stadium III [34, 36, 38, 43, 70-72] beobachtet. Während die meisten Autoren bestimmte Schwellenwerte (z.B. weniger oder mehr als 25 LK) benutzen, um einen Überlebensvorteil nachzuweisen, gelang es Swanson et al. einen linearen Anstieg im 5-Jahresüberleben bei Zunahme der LK-Zahl zu zeigen (Abb. 31). Doch bevor die Theorien, die das Phänomen versuchen zu erklären, erläutert werden, werden die Variablen vorgestellt, die mit der Anzahl untersuchter LK unmittelbar zusammenhängen.

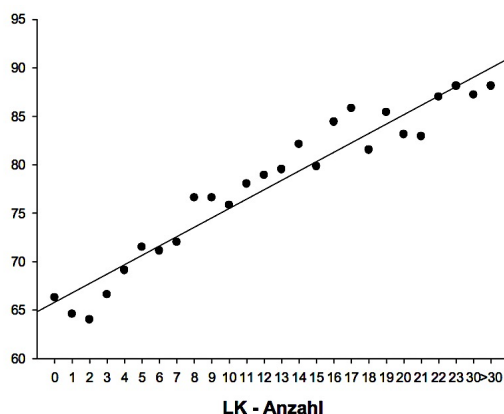


Abbildung 31: Lineare Korrelation zwischen 5-Jahresüberlebensrate und Anzahl untersuchter LK (T3N0 Kolonkarzinome), berechnet mit den Ergebnissen von Swanson et al. [28]. Abszisse: Anzahl untersuchter LK, Ordinate: 5-Jahresüberlebensrate in %.

Mit der Anzahl untersuchter LK korrelierten die LK-Größe und der MMR Enzym-Status (Abb. 11 Seite 28). Für die Variablen Patientenalter ( $p = 0.096$ ), Tumorlokalisation ( $p = 0.152$ ) und T-Stadium ( $p = 0.155$ ) konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Beim T-Stadium störte wieder die bereits erwähnte ungleiche Gewichtung der Gruppen T1/2 und T3/4.

LK-Größe und MMR Enzym-Status wurden auch von anderen Autoren als Korrelationsfaktoren identifiziert [64, 66, 73, 74]. Neben diesen werden vielfach die Faktoren Patientenalter [26, 42, 75], Tumorlokalisation [26, 42, 75, 76], T-Stadium [42, 76-78], Chirurg [26, 77, 79] und Pathologe [77, 80, 81] genannt. Bei Betge et al. war es noch der nodale Status, der mit der Anzahl der LK positiv korrelierte. Statistisch signifikant war dieser Zusammenhang jedoch nur für rektale Karzinome (Mittelwerte, N0 vs. N1/2, 15 vs. 21 LK,  $p = 0.001$ ), nicht für Kolonkarzinome (Mittelwerte, Kolon links, N0 vs. N1/2, 14 vs. 18 LK,  $p = 0.075$ ; Kolon rechts, N0 vs. N1/2, 20 vs. 22,  $p = 0.707$ ).

#### **4.4 Über die LK-Größe und deren prognostische Relevanz**

Bislang galt die Stage migration-Theorie als geeignet, den Zusammenhang zwischen LK-Anzahl und Prognose zu erklären. Sie postulierte, dass im Falle zu wenig untersuchter LK sich fälschlicherweise nodal-positive Fälle in die Gruppe der nodal-negativen einschlichen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Unzulänglichkeit der Stage migration-Theorie aufzuzeigen.

Einen ersten Zweifel ließen die nicht steigenden Raten nodal-positiver Kolonkarzinomfälle trotz erheblich verbesserter LK-Erträge aufkommen. Durch die Einführung neuer LK-Dissektionstechniken konnten die LK-Erträge deutlich gesteigert werden. In einer Übersichtsarbeit [58] zeigten acht von elf Studien, die sich diesem Thema widmeten, keinen Einfluss neuer LK-Dissektionsverfahren auf die Rate nodal-positiver Fälle [23, 45-54]. Die Kontrollgruppen der übrigen drei Studien [45, 52, 53] hatten zudem besonders niedrige Raten nodaler Positivität, weshalb der signifikante Unterschied eher aufgrund der niedrigen Raten in den

Kontrollgruppen, als aufgrund einer echten Verbesserung der Staging-Qualität zustande kam.

Aber auch unabhängig von den verbesserten Dissektionsverfahren, die noch nicht überall Standard sind, lässt sich gegen die Stage migration-Theorie argumentieren. In der gerade zitierten Übersichtsarbeit [58] analysierte der Autor die Raten nodal-positiver Fälle aus 57 Studien der Jahre 1987 bis 2015, bei denen nach konventioneller Art LK präpariert wurden. Die mittlere Rate bzw. der Median waren 39% und 38%. Interessant ist, dass die Fallrate mit insuffizienten LK-Erträgen (< 12 LK) keine Auswirkungen auf die Rate nodal-positiver Fälle hatte (Abb. 32).

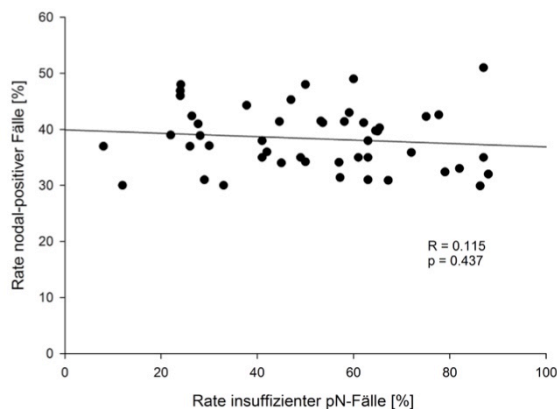


Abbildung 32: Abszisse: Fallrate insuffizienter LK-Erträge (<12 LK), Ordinate: Rate nodal-positiver Fälle. Aus *Stage migration vs immunology: The lymph node count story in colon cancer* [58]

Intuitiv würde man erwarten, dass die Ordinatenwerte in Abbildung 32 nach rechts hin abfallen. Da das nicht wirklich geschieht, kann man schlussfolgern, dass ein Großteil der metastasierten LK auch unter insuffizienten LK-Ertragsbedingungen entdeckt wurde. In die gleiche Richtung zeigen die Ergebnisse von Goldstein et al.: Sie beschäftigten sich mit den Veränderungen der LK-Zahlen über die Zeit und verzeichnete einen kontinuierlichen Anstieg der LK-Zahlen pro Fall von 3.3 in den 1950er Jahren auf 19.4 in den 1990er Jahren. Beim Erreichen einer mittleren Zahl von 8.4 LK schnellte die Rate nodaler Positivität recht abrupt nach oben, und zwar von Werten weit unter 35% auf 38-53% [82]. Das Goldstein-Beispiel lässt vermuten, dass ca. acht LK ausreichen, um eine adäquate Stadieneinteilung zu gewährleisten, und jenseits von acht LK die Stage migration-Theorie keine Rolle mehr spielt.

In einer Arbeit von Wong et al. wurden verschiedene US-amerikanische Krankenhäuser nach deren prozentualen Anteil an Patienten, bei denen  $\geq 12$  LK

untersucht wurden, unterteilt. Obgleich sich die Zahlen untersuchter LK erheblich unterschieden, waren sie alle etwa gleich effizient, um nodal-positive Tumoren zu identifizieren [83].

Schließlich soll noch eine Arbeit von George et al. aus dem Jahre 2006 erwähnt sein [84]. Sie beschäftigte sich nochmal intensiv mit der Stage migration-Theorie und arbeitete hierzu 3592 Fälle kolorektaler Karzinome auf. Das Ergebnis ihrer Analyse bestätigte nicht nur erneut den positiven Zusammenhang zwischen LK-Anzahl und Prognose, sondern zeigte auch, dass jener bei allen Krankheitsstadien (die Autoren bedienten sich der Dukes Klassifikation), besonders aber in den Stadien Dukes B ( $\approx T3/4N0$ ) und C ( $\approx N1/2$ ), vorhanden war. Das war mit der Stage migration-Theorie nicht in Einklang zu bringen. Denn wie hätten sich falsch-negative Fälle (bezogen auf den nodalen Status) in die N0-Gruppe einschleichen können, wenn mit Dukes C diese ohnehin schon als nodal-positiv erkannt worden waren? Deshalb kam auch diese Autorengruppe zum Schluss, dass diese Theorie fehlerhaft sein musste.

Abbildung 14 (Seite 31) zeigt das Überleben der Patienten, die eine Chemotherapie im Anschluss an die Operation durchführen haben lassen. Es handelte sich also um N1/2-Fälle oder um solche mit Risikofaktoren. Die Argumentation einer etwaig verpassten Chemotherapie aufgrund einer falschen Stadienzuteilung, wie es die Stage-migration-Theorie behauptet, ist bei diesen Fällen ungültig. Und doch bleibt der prognostisch günstige Effekt vieler untersuchter LK erhalten.

Wenn aber die Stage migration-Theorie die LK-Anzahl-Prognose-Relation nicht hinreichend erklärt, welche These wäre dann dazu in der Lage? Eine effektivere Klärung von Tumorzellen durch eine großzügige operative LK-Entfernung ist eine mögliche Erklärung [76, 85]; eine andere, die auch die LK-Größe mit einbezieht, ist folgende:

Das Immunsystem wurde hierfür postuliert [23, 56, 75, 86]. Das Immunsystem kann als Confounder sowohl auf die Einflussgröße (Anzahl aufgefundener LK) als auch die Zielgröße (Überleben) einwirken. Es steht mit der LK-Anzahl über die LK-Größe in Verbindung und setzt die LK-Anzahl bezüglich des Überlebens auf ein mittelbares Einflussniveau herab. Graphisch kann man sich das vorstellen wie in Abbildung 33.



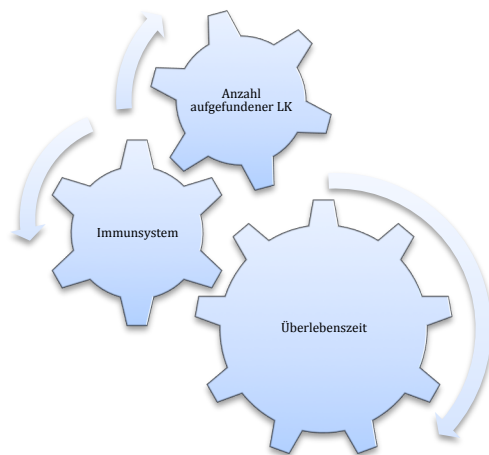


Abbildung 33: Graphik zur Veranschaulichung des Immunsystems als Confounder.

Eine effektive lokale antitumoröse Immunantwort lässt die LK wachsen. Gleichzeitig beeinflusst sie das Überleben des Patienten positiv. Märkl et al. [64] und Mayer et al. [59] waren in der Lage, zu zeigen, dass eine leichte LK-Hyperplasie, gemessen an der Zahl von LK > 5 mm, mit einer besseren Prognose vergesellschaftet ist. Diesen Zusammenhang für nodal-positive Fälle zu untersuchen, ist die zentrale Aufgabe der vorliegenden Arbeit.

Nach einer ersten Analyse zeigte sich schnell, dass sich das Konzept vom LN5-Status bei einer rein nodal-positiven Fallsammlung nicht so einfach anwenden ließ (Abb. 15, Seite 31). Ursächlich hierfür kann angenommen werden, dass in der LN5-positiven Gruppe viele Lymphknoten eingruppiert werden, die eine hohe Tumorlast tragen, dabei sollte doch die LN5-Gruppe ein Maß für eine lymph-nodale Hyperplasie sein, und nicht für eine komplette Durchsetzung des LK-Volumens durch Tumorgewebe. Ein Beispiel soll das Problem verdeutlichen: Ein 12 mm großer metastasierter LK, dessen mikroskopisch erkennbare Schnittfläche komplett mit Tumorgewebe ausgefüllt ist, erfüllt zwar das Kriterium, über 5 mm groß zu sein, ist aber kein Vertreter einer lymphofollikulären Hyperplasie. Um den Störfaktor zu korrigieren, wurde der MSR-Wert entwickelt (siehe Abschnitt 2.4): Fälle mit einem kleinen Quotient (den exakten Schwellenwert von 0.1070 lieferte eine ROC-Analyse) sollten demnach tendenziell eine bessere Prognose haben als Fälle mit großem Quotient. Die Überlebenszeitanalysen bestätigten das (Abb. 16, Seite 32, Median von 79 Monaten, 95%CI 54 - 103; vs. 38 Monaten, 95%CI 25 - 50,  $p < 0.001$ ).

Obwohl der MSR-Wert die individuellen LK-Größen schon berücksichtigt (im Nenner des Bruchs), hatte eine weitere Unterteilung zu erfolgen, um Fälle mit gleichem Quotient, aber unterschiedlich großen LK, auseinander zu halten. Man wollte ja explizit die *LK-Größe* als Surrogatmarker für das Immunsystem hinsichtlich ihres Einflusses auf das Überleben prüfen. Deshalb wurde die Unterteilung der MSR-Gruppe-1 in LN5(+) und LN5(-) vorgenommen (Abb. 4, Seite 22). Nach der Unterteilung waren es die Fälle mit mehr mittelgroßen bis großen LK, die einen Überlebensvorteil besaßen (Abb. 18, Seite 33, mittleres Überleben von 104 Monaten, 95%CI 86 - 122; vs. 66 Monaten, 95%CI 54 - 77,  $p = 0.014$ ).

In der Literatur lassen sich Arbeiten finden, die die Zusammenhänge zwischen Charakteristika des Primärtumors und LK-Eigenschaften untersuchen. Rössler et al. identifizierten einige wichtige Charakteristika, die mit der LK-Größe positiv korrelierten. Diese wurden bereits in Abschnitt 4.2 aufgezählt. Eine antitumoröse lymphozytäre Reaktion hatte, verglichen mit den anderen Faktoren, sogar den höchsten HR-Wert (hazard ratio) in Hinblick auf die LK-Größe. Lediglich in der multivariablen Testung verfehlte sie das 0.05-Niveau ( $p = 0.053$ ) [65]. Angesichts eines der statistischen Signifikanz sehr nahen p-Wertes, darf wohl von einem Zusammenhang ausgegangen werden, der vielleicht aufgrund des begrenzten Stichprobenumfangs ( $n = 148$ ) sich nicht absichern ließ. Märkl et al. lieferten mit ihrer Arbeit zum Thema *intratumorale T-Lymphozyten und LK-Eigenschaften* eindeutige Hinweise für das Zusammenspiel des Immunsystems mit LK-Größe und Prognose. So konnten sie ein erhöhtes Aufkommen intratumoraler T-Lymphozyten mit größeren Mengen aufgefundener LK, größeren LK und besserer Prognose harmonisieren [56]. Kim et al. präsentierten ganz ähnliche Ergebnisse [86]: In deren Fallkollektiv suchten sie konventionell histologisch und immunhistochemisch nach Hinweisen für erhöhte antitumoröse Immunaktivität. Eine deutliche Ausprägung inflammatorischer Zellinfiltrate im Tumor war ein positiver Prädiktor für eine große Zahl aufgefundener LK. Unter Stadium III-Patienten waren spärliche inflammatorische Zellinfiltrate mit kürzerem Überleben vergesellschaftet. Sie schlussfolgerten also, das Gesamtvolumen aufgefundener LK und die Prognose würden durch das Ausmaß einer antitumorösen Immunantwort beeinflusst. Die Ergebnisse von Rössler, Märkl und Kim bestärken die Immunhypothese.

Es ist bekannt, dass mikrosatelliten-instabile Tumoren bzw. solche mit einer MMR Enzym-Defizienz einen günstigeren Verlauf zeigen als mikrosatelliten-stabile. Erstere gelten als besonders immunogen (siehe Abschnitt 1.4) und zeigen mikroskopisch oft eine deutliche intratumorale Lymphozytose. MMR-defiziente Tumoren wurden aber auch vielfach mit größeren LK in Verbindung gebracht. Auch die eigenen Ergebnisse mögen an dieser Stelle als Beispiel dienen (mittlere Anzahl von LN5-LK bei MMR-defizienten bzw. -intakten Tumoren:  $10.1 \pm 7.4$  vs.  $7.3 \pm 5.5$ ,  $p = 0.045$ ). Weitere Tatsachen rücken MSI-positive Tumoren als Realbeispiel für die Immunsystem-Confounder-Theorie in den Fokus: MSI-positive Tumoren sind überdurchschnittlich häufig rechts lokalisiert [6, 10]. Im eigenen Fallkollektiv waren 80% der MMR-defizienten Tumoren rechts gelegen. Sowohl Tumoren der rechten Seite also auch MSI-positive Tumoren haben häufig sehr viele aufgefundene LK [26, 42, 66, 73-76]. Bei Eveno et al. waren die Mittelwerte aufgefundener LK bei MSI-positiven bzw. MSI-negativen Tumoren 23.6 bzw. 13.7 ( $p = 0.001$ ) [87].

Nachfolgende Kausalitätskette ist denkbar: MMR-defiziente Tumoren provozieren als besonders immunogene Tumoren eine antitumoröse lymphozytäre Reaktion, die sich in das regionäre Lymphabflussgebiet fortsetzt. Diese Fortsetzung induziert eine lymphatische Hyperplasie nahegelegener LK, welche deren Größenzunahme bedingt. Die vergrößerten LK werden bei der Dissektion im pathologischen Labor leichter erkannt und eingebettet. Am Ende wird deshalb eine größere Anzahl von LK untersucht und fälschlicherweise mit einer für den Patienten besseren Prognose assoziiert, obschon in Wirklichkeit die Immunogenität des Primärtumors dafür verantwortlich ist. Die LK-Größe übernimmt hier die Rolle eines (semiquantitativen) Parameters der Immunantwort.

Betge et al. veröffentlichten Ergebnisse, die sehr deutlich auf die LK-Anzahl-Prognose-Relation, insbesondere nodal-negativer Fälle, hinwiesen. Auf T3/T4- und nodal-negative Fälle angewandt, kamen sie zu Progressionsraten von 40% vs. 22% bei  $\leq 12$  LK bzw.  $> 12$  LK (krankheitsspezifisches 5-Jahres-Überleben: 67% vs. 84%) [76]. Unter Berücksichtigung dieses und anderer Ergebnisse [59, 64] darf man vermuten, dass bei nodal-negativen Fällen die Assoziation zwischen LK-Anzahl (und LK-Größe) und Überleben stärker ausgeprägt ist als bei rein nodal-positiven Fällen,

weshalb das Ergebnis aus Abb. 15 (Seite 31) zur statistischen Absicherung nicht ausreichte.

#### **4.5 Welche Rolle spielen die kleinen Lymphknoten?**

39% der untersuchten LK waren maximal 3 mm groß, 2% maximal 1 mm. Der Anteil der metastasierten LK an den unteren Größenkategorien war sehr gering: 3% der Größenkategorie 1, 3% der Größenkategorie 2, 5% der Größenkategorie 3 (Abb. 10, Seite 27). Wenn auch Metastasen in allen Größenkategorien aufgetreten sind, waren die sehr kleinen metastasierten LK niemals die einzigen pro Fall gefundenen. Bei keinem einzigen Fall war der größte aufgefundene metastasierte LK < 2 mm groß (Abb. 9, Seite 27). Es wurden also beim Auffinden kleiner Metastasen beim gleichen Patienten in der Regel auch noch größere gefunden. In 76 Fällen war der größte metastasierte LK > 10 mm groß.

Die besonders kleinen metastasierten LK mögen zur exakten N-Subklassifikation beitragen (N1a/N1b/N2a usw.), identifizieren aber nicht einen nodal-positiven Fall als solchen; dies tun in der Regel die größeren [64, 65]. Bereits Rössler et al. warfen die Frage auf, ob überhaupt nach den besonders kleinen LK gesucht werden sollte [65]. Zunächst ließen sie die Frage offen, um anschließend noch einmal Bezug zu nehmen und zu weiteren Untersuchungen aufzurufen, bevor eine allgemeine Empfehlung ausgesprochen werden könne, diese LK-„Winzlinge“ außer Acht zu lassen.

Das folgende Problem wird erkennbar: Zur Zeit (2018) stellen weniger als 12 untersuchte LK einen sog. Risikofaktor dar (siehe Abschnitt 1.6.2), bei dessen Vorhandensein eine adjuvante Chemotherapie empfohlen wird. Mit dem stetigen Erfolg und Fortschritt in der Diagnosequalität - es wird an dieser Stelle an die neuen LK-Dissektionstechniken und deren deutlich höhere LK-Erträge erinnert - werden derartige Fälle (< 12 LK) in Zukunft aus dem Risikointervall herausgleiten und verpassen so ihre prognoseverbessernde Chemotherapie - nur um der Zahl 12 willen [58]. Deshalb ist es naheliegend, Cut-off-Werte, die eine Mindestanzahl von Lymphknoten festlegen, an patienten- und tumorspezifische Parameter, welche die Anzahl aufgefundener LK nachgewiesenermaßen beeinflussen, individuell anzupassen [65].

#### 4.6 Stärken und Schwächen der vorliegenden Studie

Ein entscheidendes Novum dieser Arbeit ist die Tatsache, dass, verglichen mit anderen thematisch ähnlichen Studien, nicht nur die absoluten LK-Größen, sondern auch die intranodalen Tumoranteile eines jeden einzelnen LK mittels der in den Abschnitten 2.3 und 2.4 beschriebenen Technik ausgemessen wurden. Anhand der so gewonnenen Daten konnten weitere LK-Eigenschaften abgeleitet werden, z.B. das Verhältnis zwischen der Größe des intranodalen Tumoranteils und der Größe des LK selbst, welches schließlich zum MSR-Wert führte.

Zu Beginn des Kapitels wurde bereits angemerkt, dass pro Fall durchschnittlich 30 LK (Median: 25) untersucht wurden. Bei nur 13% der Fälle wurden weniger als 12 LK mikroskopisch untersucht. Bezogen auf den Anteil insuffizienter pN-Einstufungen entspricht das einer relativen Verbesserung um fast 400%, verglichen mit Johnson's Ergebnissen aus dem Jahr 2002, in dessen Studie bei nur 22.4% 12 oder mehr LK untersucht wurden [22].

Die vorliegende Studie behandelt Fälle der Zeiträume 2002 bis 2004 und 2007 bis 2013. Fälle der Jahre 2005 und 2006 wurden nicht in das Fallkollektiv aufgenommen, weil zu dieser Zeit am Institut der Pathologie des Klinikums Augsburg die Umstellung von konventioneller auf die methylen-blau-unterstützte LK-Dissektionstechnik stattfand. Damit zeigt sich ein Problem: Zwischen 2002 und 2004 war die mittlere Anzahl untersuchter LK 15.5 (Median: 14); zwischen 2007 und 2013 lag sie bei 39.4 (Median: 37.5). Das Ungleichgewicht hinsichtlich der LK-Zahlen ist offenkundig, verteilt sich aber sowohl auf die Studien- als auch auf die Kontrollgruppe(n); ein Umstand, der eine etwaige statistische Fehlerquelle behebt. Die Mittelwerte der Anzahl aufgefundener Metastasen pro Fall in den Zeiträumen 2002 bis 2004 und 2007 bis 2013 unterschieden sich nicht signifikant (2002 bis 2004 vs. 2007 bis 2013:  $3.95 \pm 4.05$  bzw.  $4.57 \pm 7.30$  LK-Metastasen,  $p = 0.706$ ). Dies bestätigt, dass neuere LK-Dissektionstechniken keinen oder allenfalls einen unbedeutenden Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit zur Detektion *einer* LK-Metastase haben. Weiterhin war auch die Zahl der LN5-LK pro Fall recht konstant (2002 bis 2004 vs. 2007 bis 2013:  $6.78 \pm 4.39$  bzw.  $8.39 \pm 6.46$  LN5-LK,  $p = 0.206$ ).

Abschließend soll noch auf den retrospektiven Studiencharakter und die mit diesem Studientyp verbundenen und bekannten Nachteile hingewiesen werden. So fehlten z.B. Informationen zur adjuvanten Chemotherapie und zum MMR Enzym-Status bei 23 bzw. neun Patienten. Das Ausmaß des Informationsdefizits war jedoch insgesamt nicht richtungsrelevant.

## 5 Zusammenfassung

Ziele der Arbeit waren: (1) den auf das Überleben positiven Effekt vergrößerter Lymphknoten (LK) bei nodal-positiven Kolonkarzinomfällen nachzuweisen; (2) zu zeigen, dass die Stage migration-Theorie unzureichend ist; (3) die Faktoren zu identifizieren, welche die LK-Größe und die Anzahl der LK beeinflussen. Hierzu wurde eine retrospektive Studie mit 234 nodal-positiven Kolonkarzinomfällen durchgeführt. Alle durch die Operation gewonnen LK (6969) der 234 Fälle wurden mikroskopisch untersucht. Dabei wurden die LK-Größe, das Vorhandensein etwaiger LK-Metastasen und der jeweilige intranodale Tumoranteil bestimmt. Eine anschließende statistische Analyse lieferte Informationen bezüglich lymphknotenrelevanter Parameter und Prognose. Metastasierte LK gab es bei allen Größenkategorien, öfter jedoch unter den großen LK. 51% aller metastasierter LK waren zwischen 2 und 6 mm groß. Etwa die Hälfte aller > 10 mm großen LK war nicht tumorbefallen. Fälle, deren LK einen geringen mittleren Tumoranteil hatten (kleiner MSR-Wert), zeigten einen deutlichen Überlebensvorteil: 85 (95%CI 72 - 97) vs. 67 Monate (95%CI 47 - 88),  $p < 0.001$  (Mittelwert, Gesamtüberleben). Um Fälle mit gleichem MSR-Wert, aber unterschiedlich großen LK zu unterscheiden, erfolgte eine weitere Unterteilung: Diejenigen, die mindestens 7 sog. LN5-Lymphknoten (LK > 5 mm) aufwiesen, wurden einer Gruppe LN5(+) zugerechnet, alle anderen einer Gruppe LN5(-). Die Gruppe mit einer Mindestzahl mittlerer bis großer LK [LN5(+)] hatte einen signifikanten Überlebensvorteil: 104 (95%CI 86 - 122) vs. 66 Monate (95%CI 54 - 78),  $p = 0.014$  (Mittelwert, Gesamtüberleben).

Zusammenfassend gilt, dass metastasierte LK eben nicht immer groß sind und umgekehrt große LK nicht immer metastasiert sind. Die Kombination einer Mindestzahl mittelgroßer bis großer LK (LN5) und eines kleinen MSR-Werts ist mit einer signifikant verbesserten Prognose assoziiert. In einem Modell, in dem vergrößerte LK die Rolle von Surrogatmarkern einer effektiven Immunantwort spielen, kann das Immunsystem selbst als Confounder wirken. Gleichmaßen steigert es, über eine lymphnodale Hyperplasie, die Zahl aufgefundener LK (Einflussgröße) und die Prognose (Zielgröße). Damit ist der bekannte Zusammenhang zwischen LK-Anzahl und Prognose erklärt.

## 6 Literaturverzeichnis:

1. Barnes, B., et al. *Robert Koch Institut: Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. 2016 [25.09.2017]; Available from: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen\\_download.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?__blob=publicationFile).
2. *Robert Koch Institut: 16 % Rückgang der Erkrankungsrate beim Darmkrebs seit 2003*. [cited 2017 25.09.2017]; Available from: [http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Zahl\\_des\\_Monats/Archiv2017/2017\\_2\\_Zahl\\_des\\_Monats.html](http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Zahl_des_Monats/Archiv2017/2017_2_Zahl_des_Monats.html).
3. Siegel, R.L., et al., *Colorectal cancer statistics, 2017*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2017. **67**(3): p. 177-193.
4. Pino, M.S. and D.C. Chung, *The chromosomal instability pathway in colon cancer*. Gastroenterology, 2010. **138**(6): p. 2059-72.
5. Mármol, I., et al., *Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(1).
6. Klöppel G, K.H., Remmele W, *Pathologie*. Verdauungstrakt und Peritoneum, ed. R.J. Stolte M, Klöppel G. Vol. 3. Auflage. 2013.
7. Rhee, Y.Y., K.J. Kim, and G.H. Kang, *CpG Island Methylator Phenotype-High Colorectal Cancers and Their Prognostic Implications and Relationships with the Serrated Neoplasia Pathway*. Gut Liver, 2017. **11**(1): p. 38-46.
8. Baretton, G.B., *[Serrated pathway of colorectal carcinogenesis]*. Pathologie, 2010. **31**(1): p. 9-15.
9. Fleming, M., et al., *Colorectal carcinoma: Pathologic aspects*. J Gastrointest Oncol, 2012. **3**(3): p. 153-73.
10. Jasperson, K.W., et al., *Hereditary and Familial Colon Cancer*. Gastroenterology, 2010. **138**(6): p. 2044-58.
11. Fridman, W.H., et al., *The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 298-306.
12. Armelao, F. and G. de Pretis, *Familial colorectal cancer: A review*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(28): p. 9292-8.
13. Wittekind, C., *TNM Klassifikation maligner Tumoren*, ed. UICC. Vol. 8. Auflage. 2017.
14. AWMF. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom*. 2014 [cited 2015 04/21/2015]; Available from: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>.
15. Gray, R., et al., *Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study*. Lancet, 2007. **370**(9604): p. 2020-9.
16. Hohenberger, W., et al., *Standardized surgery for colonic cancer: complete mesocolic excision and central ligation--technical notes and outcome*. Colorectal Dis, 2009. **11**(4): p. 354-64; discussion 364-5.
17. Dimitriou, N. and J. Griniatsos, *Complete mesocolic excision: Techniques and outcomes*. World J Gastrointest Oncol, 2015. **7**(12): p. 383-8.



18. West, N.P., et al., *Complete mesocolic excision with central vascular ligation produces an oncologically superior specimen compared with standard surgery for carcinoma of the colon*. J Clin Oncol, 2010. **28**(2): p. 272-8.
19. Bertelsen, C.A., et al., *Disease-free survival after complete mesocolic excision compared with conventional colon cancer surgery: a retrospective, population-based study*. Lancet Oncol, 2015. **16**(2): p. 161-8.
20. Figueredo, A., M.E. Coombes, and S. Mukherjee, *Adjuvant therapy for completely resected stage II colon cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2008(3): p. CD005390.
21. Benson, A.B., 3rd, et al., *American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer*. J Clin Oncol, 2004. **22**(16): p. 3408-19.
22. Johnson, P.M., D. Malatjalian, and G.A. Porter, *Adequacy of nodal harvest in colorectal cancer: a consecutive cohort study*. J Gastrointest Surg, 2002. **6**(6): p. 883-88; discussion 889-90.
23. Märkl, B., et al., *Methylene blue-assisted lymph node dissection technique is not associated with an increased detection of lymph node metastases in colorectal cancer*. Mod Pathol, 2013. **26**(9): p. 1246-54.
24. Märkl, B., et al., *[Lymph node preparation in colorectal cancer : Ex vivo methylene blue injection as a novel technique to improve lymph node visualization.]*. Pathologe, 2008. **29**(4): p. 274-9.
25. Chang, G.J., et al., *Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: systematic review*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(6): p. 433-41.
26. Stocchi, L., et al., *Individual surgeon, pathologist, and other factors affecting lymph node harvest in stage II colon carcinoma. is a minimum of 12 examined lymph nodes sufficient?* Ann Surg Oncol, 2011. **18**(2): p. 405-12.
27. Maggard, M.A., et al., *Are 12 nodes needed to accurately stage T1 and T2 colon cancers?* Dig Dis Sci, 2009. **54**(3): p. 640-7.
28. Swanson, R.S., et al., *The prognosis of T3N0 colon cancer is dependent on the number of lymph nodes examined*. Ann Surg Oncol, 2003. **10**(1): p. 65-71.
29. Bilimoria, K.Y., et al., *Impact of tumor location on nodal evaluation for colon cancer*. Dis Colon Rectum, 2008. **51**(2): p. 154-61.
30. Bui, L., et al., *Lymph node counts, rates of positive lymph nodes, and patient survival for colon cancer surgery in Ontario, Canada: a population-based study*. J Surg Oncol, 2006. **93**(6): p. 439-45.
31. Law, C.H., et al., *Impact of lymph node retrieval and pathological ultra-staging on the prognosis of stage II colon cancer*. J Surg Oncol 2003. **84**(3): p. 120-6.
32. Sato, H., et al., *High-risk stage II colon cancer after curative resection*. J Surg Oncol, 2011. **104**(1): p. 45-52.
33. Kelder, W., et al., *Impact of the number of histologically examined lymph nodes on prognosis in colon cancer: a population-based study in the Netherlands*. Dis Colon Rectum, 2009. **52**(2): p. 260-7.
34. Khan, H., A.J. Olszewski, and P. Somasundar, *Lymph node involvement in colon cancer patients decreases with age; a population based analysis*. Eur J Surg Oncol, 2014. **40**(11): p. 1474-80.
35. Dillman, R.O., et al., *Identification of 12 or more lymph nodes in resected colon cancer specimens as an indicator of quality performance*. Cancer, 2009.
36. Le Voyer, T.E., et al., *Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089*. J Clin Oncol, 2003. **21**(15): p. 2912-9.

37. Prandi, M., et al., *Prognostic evaluation of stage B colon cancer patients is improved by an adequate lymphadenectomy: results of a secondary analysis of a large scale adjuvant trial*. Ann Surg, 2002. **235**(4): p. 458-63.
38. Chang, Y.J., et al., *Evaluation of lymph nodes in patients with colon cancer undergoing colon resection: a population-based study*. World J Surg, 2012. **36**(8): p. 1906-14.
39. Backes, Y., et al., *The prognostic value of lymph node yield in the earliest stage of colorectal cancer: a multicenter cohort study*. BMC Med, 2017. **15**(1): p. 129.
40. Feinstein, A.R., D.M. Sosin, and C.K. Wells, *The Will Rogers phenomenon. Stage migration and new diagnostic techniques as a source of misleading statistics for survival in cancer*. N Engl J Med, 1985. **312**(25): p. 1604-8.
41. Ricciardi, R., et al., *Population-based analyses of lymph node metastases in colorectal cancer*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2006. **4**(12): p. 1522-7.
42. Gonsalves, W.I., et al., *Clinicopathologic factors associated with lymph node retrieval in resectable colon cancer: a Veterans' Affairs Central Cancer Registry (VACCR) database analysis*. J Surg Oncol, 2011. **104**(6): p. 667-71.
43. Gleisner, A.L., et al., *Nodal status, number of lymph nodes examined, and lymph node ratio: what defines prognosis after resection of colon adenocarcinoma?* J Am Coll Surg, 2013. **217**(6): p. 1090-100.
44. Baxter, N.N., et al., *An evaluation of the relationship between lymph node number and staging in pT3 colon cancer using population-based data*. Dis Colon Rectum, 2010. **53**(1): p. 65-70.
45. Ratto, C., et al., *Accurate lymph-node detection in colorectal specimens resected for cancer is of prognostic significance*. Dis Colon Rectum, 1999. **42**(2): p. 143-54; discussion 154-8.
46. Newell, K.J., et al., *GEWF solution*. Arch Pathol Lab Med, 2001. **125**(5): p. 642-5.
47. Kukreja, S.S., et al., *Increased lymph node evaluation with colorectal cancer resection: does it improve detection of stage III disease?* Arch Surg, 2009. **144**(7): p. 612-7.
48. Iversen, L.H., et al., *Increased lymph node harvest from colorectal cancer resections using GEWF solution: a randomised study*. J Clin Pathol, 2008. **61**(11): p. 1203-8.
49. van Steenberg, L.N., et al., *Improving lymph node detection in colon cancer in community hospitals and their pathology department in southern Netherlands*. Eur J Surg Oncol, 2010. **36**(2): p. 135-40.
50. Borowski, D.W., et al., *Intra-arterial Methylene blue injection into ex-vivo colorectal cancer specimens improves lymph node staging accuracy: a randomised controlled trial*. Colorectal Dis, 2014.
51. Frasson, M., et al., *Pathological evaluation of mesocolic resection quality and ex vivo methylene blue injection: what is the impact on lymph node harvest after colon resection for cancer?* Dis Colon Rectum, 2012. **55**(2): p. 197-204.
52. Jepsen, R.K., P. Ingeholm, and E.L. Lund, *Upstaging of early colorectal cancers following improved lymph node yield after methylene blue injection*. Histopathology, 2012. **61**(5): p. 788-94.
53. Kir, G., et al., *Ex vivo intra-arterial methylene blue injection in the operation theater may improve the detection of lymph node metastases in colorectal cancer*. Pathol Res Pract, 2014. **210**(12): p. 818-21.
54. Törnroos, A., et al., *Postoperative intra-arterial methylene blue injection of colorectal cancer specimens increases the number of lymph nodes recovered*. Histopathology, 2011. **58**(3): p. 408-413.

55. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. Science, 2011. **331**: p. 1565-1570.
56. Märkl, B., et al., *Number of Intratumoral T Lymphocytes Is Associated With Lymph Node Size, Lymph Node Harvest, and Outcome in Node-Negative Colon Cancer*. Am J Clin Pathol, 2016. **145**(6): p. 826-36.
57. Pages, F., *In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer*. J. Clin. Oncol., 2009. **27**: p. 5944-5951.
58. Märkl, B., *Stage migration versus immunology – the lymph node count story in colon cancer*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(43): p. 12218-12233.
59. Mayr, P., et al., *Lymph node hypoplasia is associated with adverse outcomes in node-negative colon cancer using advanced lymph node dissection methods*. Langenbecks Arch Surg, 2016. **401**(2): p. 181-8.
60. Bamboat, Z.M., et al., *Factors affecting lymph node yield from patients undergoing colectomy for cancer*. Int J Colorectal Dis, 2011. **26**(9): p. 1163-8.
61. Qiu, H.B., et al., *Ratio of metastatic to resected lymph nodes enhances to predict survival in patients with stage III colorectal cancer*. Ann Surg Oncol, 2011. **18**(6): p. 1568-74.
62. Song, Y.X., et al., *Which is the most suitable classification for colorectal cancer, log odds, the number or the ratio of positive lymph nodes?* PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28937.
63. Greenberg, R., et al., *Metastatic lymph node ratio (LNR) as a prognostic variable in colorectal cancer patients undergoing laparoscopic resection*. Tech Coloproctol, 2011. **15**(3): p. 273-9.
64. Märkl, B., et al., *The clinical significance of lymph node size in colon cancer*. Mod Pathol, 2012. **25**(10): p. 1413-22.
65. Rossler, O., et al., *Tumor size, tumor location, and antitumor inflammatory response are associated with lymph node size in colorectal cancer patients*. Mod Pathol, 2017. **30**(6): p. 897-904.
66. Sloothaak, D.A., et al., *Lymph node size as a predictor of lymphatic staging in colonic cancer*. Br J Surg, 2014. **101**(6): p. 701-6.
67. Sauer, R., et al., *Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(17): p. 1731-40.
68. Guillem, J.G., et al., *cT3N0 rectal cancer: potential overtreatment with preoperative chemoradiotherapy is warranted*. J Clin Oncol, 2008. **26**(3): p. 368-73.
69. Ogino, S., et al., *Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(20): p. 6412-20.
70. Johnson, P.M., et al., *Increasing negative lymph node count is independently associated with improved long-term survival in stage IIIB and IIIC colon cancer*. J Clin Oncol, 2006. **24**(22): p. 3570-5.
71. Vather, R., et al., *Lymph node evaluation and long-term survival in Stage II and Stage III colon cancer: a national study*. Ann Surg Oncol, 2009. **16**(3): p. 585-93.
72. Jestin, P., et al., *Cancer staging and survival in colon cancer is dependent on the quality of the pathologist' specimen examination*. Eur J Cancer, 2005. **41**(14): p. 2071-8.
73. Søreide, K., et al., *Lymph node harvest in colon cancer: influence of microsatellite instability and proximal tumor location*. World J Surg, 2009. **33**(12): p. 2695-703.
74. Berg, M., et al., *Influence of microsatellite instability and KRAS and BRAF mutations on lymph node harvest in stage I-III colon cancers*. Mol Med, 2013. **19**: p. 286-93.

75. Sarli, L., et al., *Number of lymph nodes examined and prognosis of TNM stage II colorectal cancer*. Eur J Cancer, 2005. **41**(2): p. 272-9.
76. Betge, J., et al., *Lymph node retrieval in colorectal cancer: determining factors and prognostic significance*. Int J Colorectal Dis, 2017. **32**(7): p. 991-998.
77. Mekenkamp, L.J., et al., *Lymph node retrieval in rectal cancer is dependent on many factors--the role of the tumor, the patient, the surgeon, the radiotherapist, and the pathologist*. Am J Surg Pathol, 2009. **33**(10): p. 1547-53.
78. Hsu, C.W., et al., *Factors that influence 12 or more harvested lymph nodes in early-stage colorectal cancer*. World J Surg, 2009. **33**(2): p. 333-9.
79. Dejardin, O., et al., *Volume of surgical activity and lymph node evaluation for patients with colorectal cancer in France*. Dig Liver Dis, 2012. **44**(3): p. 261-7.
80. Leung, A.M., A.W. Scharf, and H.N. Vu, *Factors affecting number of lymph nodes harvested in colorectal cancer*. J Surg Res, 2011. **168**(2): p. 224-30.
81. Valsecchi, M.E., J. Leighton, Jr., and W. Tester, *Modifiable factors that influence colon cancer lymph node sampling and examination*. Clin Colorectal Cancer, 2010. **9**(3): p. 162-7.
82. Goldstein, N.S., et al., *Lymph node recovery from colorectal resection specimens removed for adenocarcinoma. Trends over time and a recommendation for a minimum number of lymph nodes to be recovered*. Am J Clin Pathol, 1996. **106**(2): p. 209-16.
83. Wong, S.L., et al., *Hospital lymph node examination rates and survival after resection for colon cancer*. JAMA, 2007. **298**(18): p. 2149-54.
84. George, S., et al., *Will Rogers revisited: prospective observational study of survival of 3592 patients with colorectal cancer according to number of nodes examined by pathologists*. Br J Cancer, 2006. **95**(7): p. 841-7.
85. Li Destri, G., et al., *Colorectal cancer and lymph nodes: The obsession with the number 12*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(8): p. 1951-60.
86. Kim, Y.W., et al., *Histological inflammatory cell infiltration is associated with the number of lymph nodes retrieved in colorectal cancer*. Anticancer Res, 2013. **33**(11): p. 5143-50.
87. Eveno, C., et al., *Association between a high number of isolated lymph nodes in T1 to T4 N0M0 colorectal cancer and the microsatellite instability phenotype*. Arch Surg, 2010. **145**(1): p. 12-7.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungsrate, Darmkrebs, nach Lokalisation und Geschlecht, Deutschland 1999-2013.....	4
Abbildung 2: Altersstandardisierte Neuerkrankungsrate, Darmkrebs inkl. in situ-Karzinome, nach T-Stadium und Geschlecht, Deutschland 1999-2013.....	4
Abbildung 3: Altersstandardisierte Neuerkrankungsrate, in Deutschland, Skandinavien und den USA, 1970-2013.....	5
Abbildung 4: Unterteilung der Studiengruppen.....	22
Abbildung 5: Größenverteilung der Lymphknoten (linear).....	25
Abbildung 6: Größenverteilung der Lymphknoten (logarithmisch).....	26
Abbildung 7: Vergleich der Größen positiver und negativer Lymphknoten.....	26
Abbildung 8: Anzahl der Fälle mit bestimmten Metastasengrößen. ....	27
Abbildung 9: Die größten Lymphknoten-Metastasen pro Fall.....	27
Abbildung 10: Anteil positiver Lymphknoten an bestimmten Größenkategorien .....	27
Abbildung 11: Links: LK-Größe und Anzahl untersuchter LK pro Patient; Rechts: MMR Enzym-Status und Anzahl untersuchter LK pro Patient.....	28
Abbildung 12: Zusammenhang zwischen Tumorlokalisierung und Lymphknotengröße.....	29
Abbildung 13: Links: Prognostischer Effekt der Anzahl untersuchter LK pro Fall; Rechts: ROC-Kurve.....	30
Abbildung 14: Prognostischer Effekt der Anzahl untersuchter LK bei chemotherapierten Patienten .....	31
Abbildung 15: Prognostischer Effekt von LN5 auf das Gesamtüberleben .....	31
Abbildung 16: Links: Prognostischer Effekt von MSR auf das Gesamtüberleben; Rechts: ROC-Analyse .....	32
Abbildung 17: Zwei Fälle mit gleichem MSR-Wert, aber unterschiedlich großen Lymphknoten.....	32
Abbildung 18: Links: Prognostischer Effekt von LN5 auf das Gesamtüberleben bei Fällen, die der MSR-Gruppe 1 angehören; Rechts: ROC-Analyse .....	33
Abbildung 19: Vergleich der mittleren LK-Größen der Gruppen LN5(+) und LN5(-). Alle Fälle gehören der MSR-Gruppe 1 an.....	34
Abbildung 20: Regressionsanalyse und -gerade. Abhängigkeit zwischen MSR-Wert und der Anzahl befallener LK pro Fall. ....	34
Abbildung 21-29: Kaplan Meier-Kurven zur univariablen Testung.....	36/37
Abbildung 30: Anteil positiver LK an bestimmten Größenkategorien, berechnet nach den Ergebnissen von Rössler et al. ....	40
Abbildung 31: Lineare Korrelation zwischen 5-Jahresüberlebensrate und Anzahl untersuchter LK, berechnet mit den Ergebnissen von Swanson et al. ....	42
Abbildung 32: Abszisse: Fallrate insuffizienter LK-Erträge, Ordinate: Rate nodal positiver Fälle; aus stage migration vs immunology: The lymph node count story in colon cancer.....	44
Abbildung 33: Graphik zur Veranschaulichung des Immunsystems als Confounder.....	46

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Epidemiologische Kennzahlen für Darmkrebs, Deutschland 2013 .....	3
Tabelle 2: Klinisch-pathologische Daten .....	24
Tabelle 3: Uni- und multivariable Analyse .....	35
Tabelle 4: Risikoverhältnisse.....	38

## **9 Abkürzungen**

**ITL** Intratumorale T-Lymphozyten

**LK** Lymphknoten

**LN5** LN5-Einteilung (alphabetisches Wörterverzeichnis mit Erklärungen)

**LNR** Lymph node ratio (alphabetisches Wörterverzeichnis mit Erklärungen)

**MSR** Lymph node metastasis to lymph node size ratio (Material und Methoden, Abschnitt 2.4)

## **Eidesstattliche Versicherung**

Name, Vorname: Schrembs, Philipp Emanuel

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Prognostische Relevanz der Lymphknotengröße beim nodal positiven Kolonkarzinom

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Diedorf, 12.06.2019

Philipp Emanuel Schrembs